



日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

09/158,269
fr 1638
CoNir

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

2001年 1月11日

出 願 番 号
Application Number:

特願2001-003476

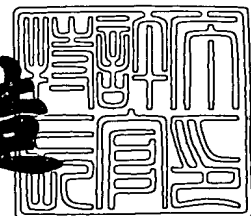
出 願 人
Applicant(s):

理化学研究所

2001年 2月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3002858

【書類名】 特許願

【整理番号】 R3-102DP1

【提出日】 平成13年 1月11日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市高野台3丁目1番地の1 理化学研究所
筑波研究所内

【氏名】 井内 聖

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市高野台3丁目1番地の1 理化学研究所
筑波研究所内

【氏名】 小林 正智

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市高野台3丁目1番地の1 理化学研究所
筑波研究所内

【氏名】 篠崎 一雄

【特許出願人】

【識別番号】 000006792

【氏名又は名称】 理化学研究所

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2000- 10056

【出願日】 平成12年 1月13日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ネオザンチン開裂酵素遺伝子を用いるトランスジェニック植物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 植物のストレス耐性を上昇させるために用いる、ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする DNA。

【請求項 2】 植物のストレス耐性を低下させるために用いる、下記 (a) から (c) のいずれかに記載の DNA。

(a) ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする遺伝子の転写産物と相補的なアンチセンス RNA をコードする DNA。

(b) ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする遺伝子の転写産物を開裂するリボザイム活性を有する RNA をコードする DNA。

(c) 植物細胞における発現時に、共抑制効果により、ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする遺伝子の発現を抑制させる RNA をコードする DNA。

【請求項 3】 ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質が、下記 (a) から (c) のいずれかに記載の蛋白質である、請求項 1 または 2 に記載の DNA。

(a) 配列番号：2、6、10、12、14、または 16 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質。

(b) 配列番号：2、6、10、12、14、または 16 に記載のアミノ酸配列において 1 または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなる蛋白質。

(c) 配列番号：1、5、9、11、13、または 15 に記載の塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする DNA がコードする蛋白質。

【請求項 4】 ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質がアラビドプシス由来である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の DNA。

【請求項 5】 請求項 1 から 4 のいずれかに記載の DNA が導入された形質転換植物細胞。

【請求項 6】 請求項 5 に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体。

【請求項 7】 請求項 6 に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンであ

る、形質転換植物体。

【請求項 8】 ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする遺伝子の発現が野生型に比べ上昇または低下している請求項 6 または 7 に記載の植物体。

【請求項 9】 アブシジン酸量が野生型に比べ上昇または低下している、請求項 6 から 8 のいずれかに記載の植物体。

【請求項 10】 ストレス耐性が野生型に比べ上昇または低下している、請求項 6 から 9 のいずれかに記載の植物体。

【請求項 11】 請求項 6 から 10 のいずれかに記載の形質転換植物体の繁殖材料。

【請求項 12】 請求項 1 から 4 のいずれかに記載の DNA を保持するベクター。

【請求項 13】 請求項 6 から 10 のいずれかに記載の形質転換植物体の製造方法であって、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の DNA を植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む方法。

【請求項 14】 請求項 1 から 4 のいずれかに記載の DNA を植物体の細胞内で発現させることを特徴とする、植物のストレス耐性を上昇または低下させる方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、植物のストレス耐性を上昇または低下させるために用いる DNA、および該 DNA のトランスジェニック植物に関する。

【0002】

【従来の技術】

植物は移動の自由を持たないため、乾燥、土壤中の塩、低温などの様々なストレスに適応しなければならない。これらのストレスの中で、乾燥は最も植物の生長に影響を与えていると考えられる。乾燥状態でも生存できるように、進化の過程で生理的・形態的に特異な形質を獲得した植物が存在する一方、他の多くの植物も乾燥ストレスに応答し、防御する機構を備えている。このような植物の渇水

に対する応答と乾燥環境への適応は、渇水時の遺伝子発現の変化を含む様々な生理学的変化によりもたらされる (Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., Plant Physiol. 115: 327-334, 1997; Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., "Molecular responses to drought stress". In Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki (eds), "Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants", R.G. LANDES company, Austin, Texas, USA, pp.11-28, 1999)。例えばシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) では、乾燥シグナルはアブシジン酸 (abscisic acid; ABA) 依存的経路とABA非依存的経路により伝達され、乾燥耐性に関わる遺伝子の発現を調節していることが知られている。これらの遺伝子産物は、例えば、ショ糖やプロリンなどの適合溶質 (osmoprotectants) の蓄積、蛋白質の半減期、ストレスシグナル伝達経路、転写などを調節する機能を果たしていると考えられている (Bray, E.A., Trends in Plant Science, 2: 48-54, 1997; Bohnert, H.J. et al., Plant Cell, 7: 1099-1111, 1995; Ingram, J. and Bartels, D., Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47: 377-403, 1996; Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., Plant Physiol. 115: 327-334, 1997; Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., "Molecular responses to drought stress". In Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki (eds), "Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants", R.G. LANDES company, Austin, Texas, USA, pp.11-28, 1999)。

【0003】

高等植物におけるABAの生合成経路としては、C40経路が考えられている。C40経路は別名カロチノイド経路ともよばれ、ゼアザンチン (zeaxanthin) のエポキシ化を経てビオラザンチン (violaxanthin)、ネオザンチン (neoxanthin)、ザントキシン (xanthoxin)、ABAアルデヒド、ABAへと合成される経路である (Zeevaart, J.A.D. and Creelman, R.A., Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39: 439-473, 1988)。この生合成経路は、生理学的な研究やABA生合成変異株の解析から予想されたものである。例えば、タバコ (*Nicotiana tabacum*) から単離されたaba2変異株は、ゼアザンチンのエポキシ化を行うゼアザンチンエポ

キシダーゼ酵素遺伝子 (aba2) に変異が入っている (Marin, E. et al., EMBO J. 15: 2331-2342, 1996)。トウモロコシから単離された vp14 変異株は、ネオザンチンからザントキシンへの変換を触媒するネオザンチン開裂酵素遺伝子 (VP14) に変異が入っている (Tan, B.C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 12235-12240, 1997)。また、シロイヌナズナからは、ザントキシンからABAアルデヒドへの反応を触媒する酵素に変異が入った aba3 変異株、ABAアルデヒドを酸化しABAを産生する反応に関与する aba4 変異株が単離されている (Schwartz, S.H. et al., 1997, Plant Physiol. 114: 161-166; Leon-Kloosterziel, K.M. et al., 1996, Plant J. 10: 655-661)。

【 0 0 0 4 】

ネオザンチン開裂酵素遺伝子 (VP14) に変異を有するトウモロコシは、水分を失いやすく萎れやすい形質を示すことは知られているが、ネオザンチン開裂酵素遺伝子を用いて、植物のストレス耐性を向上させることができるかは知られていない。

【 0 0 0 5 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、植物のストレス耐性を上昇させるために用いられるネオザンチン開裂酵素をコードするDNA、該DNAを植物に導入することにより、植物のストレス耐性を上昇させる方法、および、ネオザンチン開裂酵素の遺伝子が導入されたトランスジェニック植物を提供することを課題とする。また本発明は、植物のストレス耐性を低下させるために用いられるDNA分子、該DNAを植物に導入することにより、植物のストレス耐性を低下させる方法、および、該DNAが導入されたトランスジェニック植物を提供することを課題とする。植物のストレス耐性の上昇は、植物の品種改良などの分野において有用である。

【 0 0 0 6 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、高い耐旱性を示すカウピー (Vigna unguiculata) を10時間乾燥処理して調製したcDNAライブラリーのディファレンシャルスクリーニングにより、乾燥処理に対する応答に関わる遺伝子に対応するcDNAクローン (CPRD65) を

単離した。CPRD65 cDNA はアブシジン酸 (ABA) の生合成に関与すると考えられているネオザンチン開裂酵素をコードしていることが予想された。生育8日目のカウピーに乾燥ストレスを与えると、ABAの蓄積とCPRD65の発現が強く誘導されたことから、CPRD65遺伝子は、特に乾燥ストレス応答に深く関与していることが予想された。GST-CPRD65融合蛋白質を用いて酵素活性を調べたところ、CPRD65は9-cis-ネオザンチンを開裂しザントキシンを産生する活性を有することが確認された。これらの結果は、CPRD65遺伝子はネオザンチン開裂酵素をコードしており、その産物は、乾燥ストレス下における内生ABAの生合成において鍵となる役割を果たしていることを示している。

【0007】

本発明者らは、さらに、カウピーから単離したCPRD65遺伝子のcDNAをプローブにして、シロイヌナズナ由来cDNAライブラリーからネオザンチン開裂酵素遺伝子のスクリーニングを行い、新規遺伝子 (AtNCED3) を単離した。さらに、これらの遺伝子と相同性の高い配列を有する4種類のシロイヌナズナ由来の配列 (AtNCED1、2、4、5) を見出した。これらの遺伝子を実験室で発現させ、ネオザンチン開裂活性のアッセイを行ったところ、AtNCED1、3、および5が、CPRD65と同様にネオザンチン開裂酵素の活性を有することが判明した。

【0008】

本発明者らは、その中の1つであるAtNCED3遺伝子を例に用いてネオザンチン開裂酵素遺伝子のシロイヌナズナ形質転換植物を初めて作製した。植物細胞の遺伝子導入用ベクター (pBE2113N) の35Sプロモーター下流にセンス (過剰発現型)、またはアンチセンス (発現抑制) 方向にAtNCED3遺伝子を接続し、これを減圧浸潤法でシロイヌナズナに導入した。作製したトランスジェニック植物の乾燥耐性を評価した結果、過剰発現体では親株に比べストレス耐性が有意に上昇していることが判明した。逆に、アンチセンスを導入した発現抑制株ではストレス耐性が低下していた (図15、16)。このように本発明者らは、ネオザンチン開裂酵素遺伝子のトランスジェニック植物が、実際にストレス耐性を有意に上昇させること、さらに、該遺伝子の発現を低下させることにより、ストレス耐性を有意に低下させることができることを見出し本発明を完成させた。

【 0 0 0 9 】

即ち、本発明は、植物のストレス耐性を上昇させるために用いられるネオザンチン開裂酵素をコードするDNA、該DNAを植物に導入することにより、植物のストレス耐性を上昇させる方法、および、ネオザンチン開裂酵素の遺伝子が導入されたトランスジェニック植物、ならびに植物のストレス耐性を低下させるために用いられるDNA分子、該DNAを植物に導入することにより、植物のストレス耐性を低下させる方法、および、該DNAが導入されたトランスジェニック植物に関し、より具体的には、

(1) 植物のストレス耐性を上昇させるために用いる、ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードするDNA、

(2) 植物のストレス耐性を低下させるために用いる、下記 (a) から (c) のいずれかに記載のDNA、

(a) ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする遺伝子の転写産物と相補的なアンチセンスRNAをコードするDNA、

(b) ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする遺伝子の転写産物を開裂するリボザイム活性を有するRNAをコードするDNA、

(c) 植物細胞における発現時に、共抑制効果により、ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする遺伝子の発現を抑制させるRNAをコードするDNA、

(3) ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質が、下記 (a) から (c) のいずれかに記載の蛋白質である、(1) または (2) に記載のDNA、

(a) 配列番号：2 (AtNCED1)、6 (AtNCED3)、10 (AtNCED5)、12 (CPRD65)、14 (VP14)、または16 (LeNCED1) に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、

(b) 配列番号：2 (AtNCED1)、6 (AtNCED3)、10 (AtNCED5)、12 (CPRD65)、14 (VP14)、または16 (LeNCED1) に記載のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および/または挿入されたアミノ酸配列からなる蛋白質、

(c) 配列番号：1 (AtNCED1)、5 (AtNCED3)、9 (AtNCED5)、11 (CPRD65)、13 (VP14)、または15 (LeNCED1) に記載の塩基配列からなるDNA

とストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質、

(4) ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質がアラビドプシス由来である、(1) から (3) のいずれかに記載のDNA、

(5) (1) から (4) のいずれかに記載のDNAが導入された形質転換植物細胞

(6) (5) に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体、

(7) (6) に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体、

(8) ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする遺伝子の発現が野生型に比べ上昇または低下している (6) または (7) に記載の植物体、

(9) アブシジン酸量が野生型に比べ上昇または低下している、(6) から (8) のいずれかに記載の植物体、

(10) ストレス耐性が野生型に比べ上昇または低下している、(6) から (9) のいずれかに記載の植物体、

(11) (6) から (10) のいずれかに記載の形質転換植物体の繁殖材料、

(12) (1) から (4) のいずれかに記載のDNAを保持するベクター、

(13) (6) から (10) のいずれかに記載の形質転換植物体の製造方法であって、(1) から (4) のいずれかに記載のDNAを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む方法、

(14) (1) から (4) のいずれかに記載のDNAを植物体の細胞内で発現させることを特徴とする、植物のストレス耐性を上昇または低下させる方法、を提供するものである。

【0010】

なお、本発明において「ストレス耐性」とは、乾燥ストレス耐性、塩ストレス耐性、低温ストレス耐性、大気汚染耐性、低酸素状態に対する耐性、病原菌耐性、および農薬などの薬剤耐性などの環境ストレスに対する耐性を指す。ABAを外から処理することにより多くの植物で、これらのストレスに対する耐性が上昇することが知られている（高橋信孝・増田芳雄共編、植物ホルモンハンドブック（下）、pp.78-160、培風館；およびそこに引用されている文献を参照のこと）。

【 0 0 1 1 】

【発明の実施の形態】

本発明は、ストレス耐性を上昇させるために用いる、ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードするDNAに関する。ネオザンチン開裂酵素の遺伝子は、これまでABAの生合成に関与する酵素としては知られていたが、この酵素をコードするDNAを植物に導入することにより、実際にABAの蓄積がもたらされ、植物体の生育に重大な影響を与えることなくストレスに対する耐性を向上させることができるかどうかは知られていなかった。

【 0 0 1 2 】

例えば、外部からABAを植物に処理すると、多くの植物において生育阻害などが認められる。また、種子においても、ABA処理により生育阻害（発芽阻害）が起きることが知られている（高橋信孝・増田芳雄共編、植物ホルモンハンドブック（下）、pp.78-160、培風館；およびそこに引用されている文献を参照のこと）。このように、ABAレベルの上昇は、植物に対し様々な障害をもたらす。外来遺伝子によるABAの過剰生産が、ストレス耐性の獲得につながるかどうかの情報は全くなかった。これまで行われてきた研究手法においては外部からABAを処理していたが、高い処理濃度が必要なため発育阻害が強く、正確な耐性評価に結びつかなかった。また外部からの処理実験では、正常に発育しつつ耐性を獲得するようなABAレベルがありうるのかどうか不明であった。本発明において、ABA生合成遺伝子の取得とこれを用いた形質転換植物の作成を行うことにより、植物のストレス耐性が上昇することが初めて実証された。

【 0 0 1 3 】

ストレス耐性を上昇させるために用いるDNAとしては、ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードしている限り制限はない。現在、ネオザンチン開裂酵素の遺伝子としては、トウモロコシ（Zea mays）のVP14（Schwartz, S. H. et al., Science 276: 1872-1874, 1997; Tan, B. V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 12235-12240, 1997）（cDNA：配列番号13、蛋白質：配列番号：14）、トマト（Lycopersicon esculentum）のLeNCED1（Burbidge, A. et al., J. Exp. Bot., 47: 2111-2112, 1997; Burbidge, A. et al., Plant J. 17:427-4

31, 1999) (cDNA: 配列番号 15、蛋白質: 配列番号: 16) 等が単離されている。これらの遺伝子は、ストレス耐性を上昇させるために有用であり、本発明において用いられ得る。また、AtNCED1 (配列番号: 2)、AtNCED3 (配列番号: 6)、AtNCED5 (配列番号: 10)、および CPRD65 (配列番号: 12) をコードする DNA (それぞれ、配列番号: 1、5、9、および 11) も好適に用いられ得る。また、配列番号: 18 に記載のネオザンチン開裂酵素をコードする DNA (cDNA, 配列番号: 17、蛋白質, 配列番号: 18) (Neill, S.J. et al., J. Exp. Bot., 49: 1893-1894, 1998, Ac. No. AJ005813) も本発明において用いられ得る。ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする DNA は、ストレス耐性を上昇させるための試薬 (ストレス耐性上昇剤) ともなる。また本発明は、ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする DNA のストレス耐性を上昇させるための使用を提供する。

【0014】

本発明のネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする DNA には、ゲノム DNA、cDNA、および化学合成 DNA が含まれる。ゲノム DNA および cDNA の調製は、当業者にとって常套手段を利用して行うことが可能である。ゲノム DNA は、例えば、植物体から常法に従ってゲノム DNA を抽出し、ゲノミックライブラリー (ベクターとしては、プラスミド、ファージ、コスミド、BAC などが利用できる) を作成し、これを展開して、本発明の DNA (例えば、配列番号: 1、5、9、11、13、または 15 など) を基に調製したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションあるいはブランクハイブリダイゼーションを行うことにより調製することが可能である。また、本発明の DNA (例えば、配列番号: 1、5、9、11、13、または 15 など) に特異的なプライマーを作成し、これを利用した PCR を行うことによって調製することも可能である。また、cDNA は、植物体から抽出した mRNA を基に cDNA を合成し、これを λ ファージベクター等のベクターに挿入して cDNA ライブラリーを作成し、これを展開して、上記と同様にコロニーハイブリダイゼーションあるいはブランクハイブリダイゼーションを行うことにより、また、PCR を行うことにより調製することが可能である。また、本発明の DNA には、配列番号: 1、5、9、11、13、または 15 に記載の DNA 配列のみならず、各

蛋白質のアミノ酸をコードするコドンの任意の縮重に基づく塩基配列からなるDNAが含まれる。

【 0 0 1 5 】

また本発明のDNAには、例えば、配列番号：2、6、10、12、14、または16に記載の蛋白質において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなり、ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードするDNAが含まれる。このようなDNAには、配列番号：1、5、9、11、13、または15に記載の天然の植物由来の遺伝子の変異体、誘導体、アレル、バリエーションおよびホモログが含まれる。

【 0 0 1 6 】

アミノ酸配列が改変された蛋白質をコードするDNAを調製するための当業者によく知られた方法としては、例えば、PCRによるin vitro変異導入法が挙げられる（伊沢毅、PCRによるin vitro mutagenesis、151-158頁、監修 島本功、佐々木卓治、細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ7新版植物のPCR実験プロトコール、秀潤社）。蛋白質におけるアミノ酸の改変は、人為的に行うのであれば、通常、200アミノ酸以内、好ましくは100アミノ酸以内、さらに好ましくは50アミノ酸以内、さらに好ましくは10アミノ酸以内である。また、塩基配列の変異によりコードする蛋白質のアミノ酸配列が変異することは、自然界においても生じ得る。このように天然型のネオザンチン開裂酵素をコードするアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAであっても、ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする限り、本発明のDNAに含まれる。また、例えば、塩基配列が変異した場合でも、それが蛋白質中のアミノ酸の変異を伴わない場合（縮重変異）もあり、このような縮重変異体も本発明のDNAに含まれる。

【 0 0 1 7 】

あるDNAがネオザンチン開裂酵素をコードしているか否かは、実施例5に記載されているように、大腸菌でDNAを発現させて組換え蛋白質を調製し、シス-ネオザンチンを基質としてその開裂を検出することにより決定することができる。

【 0 0 1 8 】

また、既知のネオザンチン開裂酵素をコードするDNAを基に、新たにネオザンチン開裂酵素遺伝子を単離することもできる。このための当業者によく知られた方法としては、ハイブリダイゼーション技術 (Maniatis, T. et al., 1982, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press) やポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術 (中山広樹著, 細胞工学別冊バイオ実験イラストレイテッド第3巻新版, 秀潤社, 1998) を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者にとっては、既知のネオザンチン開裂酵素遺伝子の塩基配列 (例えば、配列番号: 1、5、9、11、13、または15などの配列) もしくはその一部をプローブとして、またこれらの配列に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、任意の植物からネオザンチン開裂酵素遺伝子をコードするDNAを単離することは通常行いうることである。このようにハイブリダイズ技術やPCR技術により単離しうるネオザンチン開裂酵素をコードするDNAもまた本発明のストレス耐性を上昇させるために用いるDNAに含まれる。

【 0 0 1 9 】

ストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件を示せば、例えばプローブには、ランダムプライム法を用いて³²PラベルしたDNAを用いる。ハイブリダイゼーション解析は、例えば文献記載の方法に従って行うことができる (Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。DNAをナイロンフィルターに転写し、 [³²P]ラベルした断片と、例えば30%好ましくは50%ホルムアミド、6×SSC、5×Denhardt溶液、および 100 μg/mlの変性サケ精子DNA中で、37℃好ましくは42℃でハイブリダイズさせる。ストリンジェントな条件における洗浄は、例えば 1×SSC、1% SDS (室温) で15分の洗浄を2回、好ましくは (よりストリンジェント) 0.5×SSC、0.5% SDS (37℃) で15分の洗浄を2回、より好ましくは (さらにストリンジェント) 0.1×SSC、0.1% SDS (60℃) 15分の洗浄を2回行い、オートラジオグラフィーを行なう。「ストリンジェントな条件でハイブリダイズさせる」ことにより、上記の条件下で対象とする核酸に対して、塩基対の非共有結合的な平衡結合を特異的に生じさせることができる。

【 0 0 2 0 】

本発明のDNAによりコードされる蛋白質は、通常、配列番号：2、6、10、12、14、または16に記載の蛋白質とアミノ酸配列において少なくとも70%（例えば80%以上、90%以上、95%以上、または99%以上）の同一性を有する。ここで、2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列の同一性（percent identity）は、KarlinおよびAltschul（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268, 1990）により構築され、KarlinおよびAltschul（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877, 1993）により改変されたアルゴリズムを用いて決定することができる。このようなアルゴリズムはAltschulら（J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990）のNBLASTおよびXBLAST等のプログラムに取り込まれている。BLASTの塩基配列の検索はNBLASTプログラム等により score = 100, wordlength = 12 で行うことができる。BLASTの蛋白質の検索はXBLASTプログラム等により score = 50, wordlength = 3 で行うことができる。2つの配列間でギャップが存在する場合は、Altschulら（Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997）により記載されたGapped BLAST等を用いることができる。BLASTやGapped BLASTを用いる場合、それぞれのプログラム（すなわちNBLASTおよびXBLAST等）のデフォルトのパラメーターを用いることができる（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>）。

【 0 0 2 1 】

また、配列番号：2、6、10、12、14、または16に記載のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入などにより改変された蛋白質をコードするDNAには、例えば、少なくとも1つのアミノ酸の保存的置換により得られる蛋白質をコードするDNAが含まれる。「アミノ酸の保存的置換」とは、あるアミノ酸残基を、このアミノ酸が属する、互いにアミノ酸の側鎖の化学的性質が類似しているグループ内の別のアミノ酸に置換することを言う。類似した側鎖を持つアミノ酸残基のグループは当分野において知られている。これらのグループには、塩基性側鎖（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロ

イシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、 β 分岐側鎖(例えばスレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族側鎖(例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が挙げられる。

【0022】

上記のようにして本発明のDNAを単離すれば、これを植物のストレス耐性の調節に用いることができる。ここで「単離されたDNA」とは、天然のDNAのいずれの構造とも同一でないか、あるいは少なくとも3つの別々の遺伝子を含む天然のゲノムDNA断片のいずれの構造とも同一でない構造を有するDNAを指す。従って、この用語は、例えば、(a)天然の生物のゲノムにおける天然のゲノムDNA分子の部分配列を持つDNA、(b)ベクターあるいは原核生物または真核生物のゲノムDNAに導入されたDNAで、その結果生じた分子が天然のベクターまたはゲノムDNAと同一でないDNA、(c)cDNA、ゲノム断片、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により産生された断片、または制限酵素切断断片などの分離された分子、ならびに(d)ハイブリッド遺伝子すなわち融合蛋白質をコードする遺伝子の部分である組み換え核酸配列、などが含まれる。但し、例えばcDNAまたはゲノムDNAのライブラリーなど、(i)異なるDNA分子の混合物中、(ii)異なるトランスフェクトされた細胞の混合物中、もしくは(iii)異なる細胞クローンの混合物中、に存在するDNA分子は単離されたDNAに含まれない。

【0023】

これらのDNAを用いてストレス耐性を上昇させた形質転換植物体を作製する場合には、該DNAを適当なベクターに挿入して、これを植物細胞に導入し、これにより得られた形質転換植物細胞を再生させる。

【0024】

植物細胞の形質転換に用いられるベクターとしては、該細胞内で挿入遺伝子を発現させることが可能なものであれば特に制限はない。例えば、植物細胞内での恒常的な遺伝子発現を行うためのプロモーター(例えば、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター)を有するベクターや外的刺激により誘導的に活性化されるプロモーターを有するベクターを用いることも可能である。また、植物の組織特異的なプロモーターを用いて、組織特異的に目的の遺伝子の発現を誘導

すれば、ストレスに感受性が高い組織に特異的にストレス耐性を付与することが可能である。例えば、種子特異的な発現をするインゲンの β -ファセオリン遺伝子 (Bustos et al., EMBO J. 10:1469-1479 1991) やダイズのグリシニン遺伝子 (Lelievre et al., Plant Physiol. 98:387-391, 1992)、葉特異的な発現をするエンドウのRbcS遺伝子 (Lam and Chua, Science 248:471-474, 1990) やコムギのCab1遺伝子 (Gotorn et al., Plant J. 3:509-518, 1993)、根特異的な発現をするタバコのTobRB7遺伝子 (Yamamoto et al., Plant Cell, 3:371-382, 1991) などのプロモーターを用いることによって、目的の遺伝子を組織特異的に発現させることが可能である。また、外的な刺激により誘導的に活性化されるプロモーターを有するベクターを用いることも可能である。例えば、乾燥や塩あるいは低温ストレスなどの環境ストレスに応答するプロモーターとしてrd29A遺伝子 (Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. Plant Cell 6:251-264 1994) のプロモーターが挙げられる。また、乾燥、高塩濃度などの環境ストレスによって活性化するプロモーターも本発明において好適に用いられる。このようなプロモーターとしては、シロイヌナズナ AtNCED3 遺伝子およびカウピー CPRD65 遺伝子のプロモーターなどが挙げられる。さらに、薬剤によって誘導される発現システムを用いることによって、目的の遺伝子を任意の時期にかつ任意の組織に発現させることが可能である。例えば、ステロイドホルモン(グルココルチコイド)によって誘導される発現システムとしてとしてGVG 遺伝子 (GAL4, VP16, Glucocorticoid receptor) を利用した誘導系 (Aoyama, T. and Chua, N. H. Plant J. 11:605-12, 1997) が挙げられる。

【0025】

ベクターを挿入する植物細胞としては、特に制限はないが、例えば、シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana)、イネ (Oriza sativa)、タバコ (Nicotiana tabacum)、トマト (Lycopersicon esculentum)、ジャガイモ (Solanum tuberosum)、トウモロコシ (Zea mays)、ミヤコグサ (Lotus japonicus) 等が挙げられる。またその他の農作物や樹木等に対しても有用である。植物は針葉樹、広葉樹、双子葉植物、単子葉植物などいずれでもよい。なお、ここでいう「植物細胞」には、種々の形態の植物細胞、例えば、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉の切

片、カルスなどが含まれる。

【0026】

植物細胞へのベクターの導入は、ポリエチレングリコール法、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、アグロバクテリウム法、減圧浸透法、パーティクルガン法など当業者に公知の種々の方法を用いることができる。形質転換植物細胞からの植物体の再生は、植物細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である。例えば、イネおよびシロイヌナズナ等の形質転換体の作製は、文献「島本功・岡田清孝監修、モデル植物の実験プロトコール、細胞工学別冊、植物細胞工学シリーズ4、秀潤社」に従って行うことができる。

【0027】

一旦、ゲノム内に本発明のDNAが導入された形質転換植物体が得られれば、該植物体から有性生殖または無性生殖により子孫を得ることが可能である。また、該植物体やその子孫あるいはクローンから繁殖材料（例えば、種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラスト等）を得て、それらを基に該植物体を量産することも可能である。本発明には、本発明のDNAが導入された植物細胞、該細胞を含む植物体、該植物体の子孫およびクローン、並びに該植物体、その子孫、およびクロンの繁殖材料が含まれる。

【0028】

このようにして作出された形質転換植物体は、野生型植物体と比較して、ABA含量が上昇している。あるいは、これらの形質転換植物体は、野生型植物体と比較して、そのストレス耐性が上昇している。ストレス耐性は、公知の方法により比較することができる。例えば、実施例に記載されているように、乾燥、高塩、低温、または高温などのストレス条件下で植物体を栽培し、その生長を比較すればよい。例えば、見かけの状態、植物体や葉、茎、根などの組織のサイズ、重量（生重量または乾燥重量）、色、相対生長速度、または光合成活性などを指標にして比較することができる。ストレス耐性は、少なくとも植物のいずれかの組織で上昇していればよい。また、植物体のABAレベルの測定は、イムノアッセイ、薄層クロマトグラフィー（TLC）、ガスクロマトグラフィー（GC）、HPLCなどの方法が知られている（高橋信孝・増田芳雄共編、植物ホルモンハンドブック（下）

、pp.1-21、培風館；およびそこに引用されている文献を参照のこと）。例えば実施例 7 に記載されたように、ラベル化した ABA を内部標準に用い、HPLC を用いた粗精製画分を最終的に GC・MS で定量することにより、信頼性の高い定量が可能である。

【 0 0 2 9 】

本発明により、乾燥地帯、寒冷地、高塩濃度などの環境ストレスに曝されている地域でも有用作物の栽培が可能となる。また、作物以外の植物に適用して、環境緑化に応用することも可能である。

【 0 0 3 0 】

また、本発明は、ストレス耐性を低下させるために用いる、ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする遺伝子の発現を低下させることができる DNA に関する。該 DNA は、ストレス耐性を低下させるための試薬（ストレス耐性低下剤）ともなる。また本発明は、ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする遺伝子の発現を低下させることができる DNA のストレス耐性を低下させるための使用を提供する。

【 0 0 3 1 】

ストレス耐性が低下した植物は、雑草などに適用して環境から排除するために有用である。例えば、ストレス耐性の低下を誘導できるような植物を作製して、土地改良などに応用することができる。雑草のような生殖能力の高い植物品種に、化学物質（例えばグルココルチコイドなど）で誘導されるプロモーター下流にネオザンチン開裂酵素遺伝子の発現を抑制（例えばアンチセンス方向）するようなコンストラクトを導入する。この形質転換植物は化学物質が加えられなければ正常に生育するため、荒れ果てた土地において数年間その雑草を育てることによって土地を改良させることができる。その後、グルココルチコイドを散布することによって特異的に雑草のストレス耐性を低下させ、一網打尽に雑草を排除する。そして、栽培作物を作付けする。栽培作物は、ネオザンチン開裂酵素を過剰に発現する形質転換作物（センス方向に導入した植物）などを作付けすることができる。

【 0 0 3 2 】

本発明者らは、ネオザンチン開裂酵素遺伝子のアンチセンスRNAを発現する遺伝子構築物を用いて、ネオザンチン開裂酵素の発現を人為的に抑制した形質転換植物を初めて作出することに成功した。この植物体は、無灌水条件で野生型に比べ有意に枯れやすく、ストレス耐性が低下していることが判明した（図15、16）。このように、本発明者らは、ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする遺伝子の発現を人為的に抑制する方法を確立し、これにより植物体のストレス耐性を低下させることに成功した。

【0033】

本発明において、植物のストレス耐性を低下させるには、ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする遺伝子の発現を低下させればよい。ここで遺伝子の発現には、遺伝子の転写および転写産物の翻訳が含まれる。また、発現の抑制には発現の完全な停止も含まれる。ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする遺伝子の転写や翻訳を抑制するには、該遺伝子をコードするDNA、その転写調節領域、または該遺伝子の転写産物を標的として、該遺伝子の発現を抑制すればよい。

【0034】

本発明を適用する植物としては特に制限はなく、様々な植物を用いることができる。例えばシロイヌナズナなどが用いられる。また、発現を抑制する標的となりうるネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする遺伝子としては、例えば、トウモロコシ (*Zea mays*) であればVP14 (Schwartz, S.H. et al., Science . 276: 1872-1874, 1997; Tan, B.V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 12235-12240, 1997) (cDNA: 配列番号13、蛋白質: 配列番号: 14)、トマト (*Lycopersicon esculentum*) であればLeNCED1 (Burbidge, A. et al., J. Exp. Bot., 47: 2111-2112, 1997; Burbidge, A. et al., Plant J., 17:427-431, 1999) (cDNA: 配列番号15、蛋白質: 配列番号: 16)、シロイヌナズナであれば、AtNCED1 (cDNA: 配列番号: 1、蛋白質: 配列番号: 2)、AtNCED3 (cDNA: 配列番号: 5、蛋白質: 配列番号: 6)、および/またはAtNCED5 (cDNA: 配列番号: 9、蛋白質: 配列番号: 10)、カウピーであればCPRD65 (cDNA: 配列番号11、蛋白質: 配列番号: 12) 等が挙げられる。他の植物由来のホモログ

遺伝子も標的となりうる。他の植物のホモログ遺伝子は、例えば上記したハイブリダイゼーション等により同定・単離することが可能である。なお、本発明においてある植物のストレス耐性を低下させるために、他種植物の遺伝子または遺伝子配列情報（例えば上記の遺伝子）を利用して、ジーンサイレンシング法やアンチセンス法のような周知の方法を用いて、目的とする植物の標的遺伝子の発現を抑制することも可能である。従って、目的とする植物が有する標的遺伝子は、必ずしも単離または同定されていなくてもよい。

【 0 0 3 5 】

本発明におけるネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする遺伝子の発現の抑制は、該遺伝子の発現を抑制するためのDNAを適当なベクターに挿入して、これを植物細胞に導入し、これにより得られた形質転換植物細胞を再生させることにより行うことができる。プロモーターとしては特に制限はなく、例えば上記のストレス耐性を上昇させる場合と同様のプロモーターを用いることができる。例えば、発現誘導型のプロモーターを用いれば、特定の条件でのみストレス耐性を低下させることができる。

【 0 0 3 6 】

植物における特定の内在性遺伝子の発現を抑制する方法としては、アンチセンス技術を利用する方法が当業者に最もよく利用されている。

アンチセンス法とは、ある遺伝子から転写されたRNAに相補的なDNA分子（アンチセンス核酸）を用いて標的mRNAと二重鎖を形成させ、その発現を抑制しようとする人為的遺伝子発現制御法である。アンチセンスによる遺伝子発現制御法は1960年から1970年に見出され、1978年にはZamecnikらがアンチセンスオリゴマーを用いてニワトリ・ラウス肉腫ウイルスの複製および逆転写酵素の活性阻害を行うことに成功している(Zamecnik, P.C. and Stephenson, M.L. 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 280-284)。

【 0 0 3 7 】

アンチセンスDNAを導入する方法には、アンチセンスオリゴマーを直接細胞内に投与する方法や発現ベクターに標的遺伝子のアンチセンスDNAをつないで形質転換を行う方法があり、後述する実施例では後者を用いた例を記載している。具

体的には、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターの下流にネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする遺伝子のcDNAをアンチセンス方向につないで植物細胞に導入する。植物細胞におけるアンチセンス効果は、Eckerらが一時的遺伝子発現法を用いて電気穿孔法により導入したアンチセンスRNAが植物においてアンチセンス効果を発揮することで初めて実証された(Ecker, J.R. and Davis, R.W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:5372, 1986)。その後、タバコやペチュニアにおいても、アンチセンスRNAの発現によって標的遺伝子の発現を抑制する例が報告されており(van der Krol, A.R. et al., Nature, 333:866, 1988)、現在では植物における遺伝子発現抑制の手段としてアンチセンス法は確立した技術である。アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNAポリメラーゼにより局所的に開状ループ構造が作られた部位とのハイブリッド形成による転写抑制、合成の進行しつつあるRNAとのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNAとのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNAの翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻害、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現制御などである。これらは、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、標的遺伝子の発現を抑制する(平島および井上「新生化学実験講座2 核酸IV 遺伝子の複製と発現」, 日本生化学会編, 東京化学同人, pp.319-347, 1993)。

【0038】

アンチセンスDNAの配列は、形質転換する植物が持つネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする内在性遺伝子の転写産物またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。転写されたRNAは、標的とする遺伝子の転写産物に対して好

ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相補性を有する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンスDNAの長さは、少なくとも15塩基以上であり、好ましくは100塩基以上であり、さらに好ましくは500塩基以上である。通常、用いられるアンチセンスDNAの長さは5kbよりも短く、好ましくは2.5kbよりも短い。

【 0 0 3 9 】

内在性遺伝子の発現の抑制は、また、リボザイムをコードするDNAを利用して行うことも可能である。近年、リボザイムをコードするDNAを利用して遺伝子の発現抑制を行う研究がなされている。リボザイムとは生体内の反応を触媒する活性を持つRNAである。リボザイムには様々な活性を有するものがあるが、とりわけRNAを切断する酵素としてのリボザイムの研究により、RNAの部位特異的な切断を目的とするリボザイムの設計が可能となった。リボザイムには、グループIイントロン型や、RNasePに含まれるMIRNAのように400ヌクレオチド以上の大きなものもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある（小泉誠・大塚栄子,蛋白質核酸酵素, 35:2191, 1990）。

【 0 0 4 0 】

たとえば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15のC15の3'側を切断するが、活性にはU14が9位のAと塩基対を形成することが重要とされ、15位の塩基はCのほかにAまたはUでも切断されることが示されている(Koizumi, M. et al., FEBS Lett. 228:225, 1988)。リボザイムの基質結合部位を標的部位近傍のRNA配列と相補的になるように設計すれば、標的RNA中のUC、UUまたはUAという配列を認識する制限酵素的な切断リボザイムを作ることが可能である(Koizumi, M. et al., FEBS Lett., 239:285, 1988; 小泉誠・大塚栄子, 蛋白質核酸酵素, 35:2191, 1990; Koizumi, M. et al., Nucleic Acids Res., 17:7059, 1989)。例えば、アラビドプシスのAtNCED3遺伝子のコード領域には、このような部位が数百箇所存在する。また、ヘアピン型リボザイムは、たとえばタバコリングスポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖に見出される(Buzayan, J. M., Nature 323:349, 1986)。このリボザイムも、標的特異的なRNA切断を起

こすように設計できることが示されている(Kikuchi, Y. and Sasaki, N., *Nucleic Acids Res.* 19:6751, 1992 ; 菊池洋, 化学と生物, 30:112, 1992)。

【 0 0 4 1 】

標的を切断できるように設計されたりボザイムは、植物細胞中で転写されるようにカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターなどのプロモーターおよび転写終結配列に連結される。しかし、その際、転写されたRNAの5'末端や3'末端に余分な配列が付加されているとリボザイムの活性が消失する可能性がある。このようなとき、転写されたりボザイムを含むRNAからリボザイム部分だけを正確に切り出すために、リボザイム部分の5'側や3'側にトリミングを行うためのシスに働く別のトリミングリボザイムを配置させることも可能である(Taira, K. et al., *Protein Eng.* 3:733, 1990 ; Dzianott, A. M. and Bujarski, J. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:4823, 1989 ; Grosshans, C. A. and Cech, R. T., *Nucleic Acids Res.*, 19:3875, 1991; Taira, K. et al., *Nucleic Acids Res.* 19:5125, 1991)。また、このような構成単位をタンデムに並べ、標的遺伝子内の複数の部位を切断できるようにして、より効果を高めることもできる(Yuyama, N. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186:1271, 1992)。このようなりボザイムを用いて本発明で標的となる遺伝子の転写産物を切断し、当該遺伝子の発現を抑制することが可能である。リボザイムは、標的となる遺伝子の転写産物を特異的に切断することが好ましい。このようなりボザイムを用いて本発明で標的となる遺伝子の転写産物を特異的に切断し、該遺伝子の発現を抑制することができる。

【 0 0 4 2 】

内在性遺伝子の発現の抑制は、さらに、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有するDNAの形質転換によってもたらされる共抑制によっても達成される。「共抑制」とは、植物に標的内在性遺伝子と同一若しくは類似した配列を有する遺伝子を形質転換により導入すると、導入する外来遺伝子および標的内在性遺伝子の両方の発現が抑制される現象のことをいう。共抑制の機構の詳細は明らかではないが、植物においてはしばしば観察される(Curr. Biol. 7: R793, 1997, Curr. Biol. 6:810, 1996)。例えば、ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質

をコードする遺伝子の発現が共抑制された植物体を得るためには、ネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする遺伝子若しくはこれと類似した配列を有するDNAを発現できるように作製したベクターDNAを目的の植物へ形質転換し、得られた植物体からネオザンチン開裂活性を有する蛋白質をコードする遺伝子の発現が低下した形質を有する植物を選択すればよい。

共抑制に用いる遺伝子は、標的遺伝子と完全に同一である必要はないが、通常、少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の配列の同一性を有する。同一性または相補性を決定するために遺伝子情報処理ソフトウェアであるGenetyx(ソフトウェア開発株式会社)を用いることができる。このプログラムはLipman-Pearson法 (Lipman, D.J. and Pearson, W. R. 1985, Science 227:1435-1441) を採用している。この方法は、まず配列データを比較し、相同性の高い配列データについて、配列の欠落(GAP)を考慮し相同性を算出する。

【 0 0 4 3 】

本発明で利用される、遺伝子の発現を抑制する機能を有する上記のようなDNAを利用してストレス耐性が低下した形質転換植物体を作製する場合には、該DNAを適当なベクターに挿入して、これを植物細胞に導入し、これにより得られた形質転換植物細胞を再生させる。用いられるベクターとしては、植物細胞内で挿入遺伝子が発現させることが可能なものであれば、上記のストレス耐性を上昇させる場合と同様に特に制限はない。ベクターを挿入する植物細胞としても特に制限はない。植物は針葉樹、広葉樹、双子葉植物、単子葉植物などいずれでもよい。なお、ここでいう「植物細胞」には、種々の形態の植物細胞、例えば、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉の切片、カルスなどが含まれる。

【 0 0 4 4 】

植物細胞へのベクターの導入、および形質転換植物細胞からの植物体の再生は、上記のストレス耐性を上昇させる場合と同様、植物細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である。一旦、ゲノム内に本発明のDNAが導入された形質転換植物体が得られれば、該植物体から有性生殖または無性生殖により子孫を得ることが可能である。また、該植物体やその子孫あるいはクローンから

繁殖材料（例えば、種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラスト等）を得て、それらを基に該植物体を量産することも可能である。本発明には、本発明のDNAが導入された植物細胞、該細胞を含む植物体、該植物体の子孫およびクローン、並びに該植物体、その子孫、およびクローンの繁殖材料が含まれる。

【 0 0 4 5 】

このようにして作出された形質転換植物体は、野生型植物体と比較して、ABA含量が低下している。あるいは、これらの形質転換植物体は、野生型植物体と比較して、そのストレス耐性が低下している。このような植物は、例えば雑草などに適用して、効果的な除草を行うことができる。また、上記のように誘導性のプロモーターを利用することで、本発明の形質転換植物体を土地改良などに利用することが可能である。

【 0 0 4 6 】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本実施例において汎用した実験条件を以下に示す。

・ カウピーの生育

カウピーの種 (*Vigna unguiculata* IT84S-2246-4) を鉢に播き、温室で8日間、16時間明期（自然光に加え照度不足時は人工灯による補光）、25℃の条件下で、適度に水を撒きながら生育させた。

・ 乾燥処理

乾燥処理は、植物体を傷つけないように鉢から引き出し、計量後、室温、湿度約60%、弱光（300 lux）の条件下 Whatman 3MM 濾紙上に置くことで行った。コントロールでは、植物を鉢から取り出し、すぐによく水を含んだ土に戻して乾燥処理群と同じ条件下で維持した。

・ DNA配列分析

自動プラスミド単離システム Model PI-100 (KURABO) を用いてプラスミドDNAの鋳型を調製し、DNAシーケンサー Model 373A (ABI) で配列を決定した。塩

基配列およびアミノ酸配列は GeneWorks ソフトウェアシステム (IntelliGenetics, Inc.)、Sequencher 3.0 (Hitachi Software) およびウイスコンシン大学 Genetic Computer Group (GCG) プログラムを用いて解析した。

【 0 0 4 7 】

〔実施例 1〕 乾燥処理により誘導される遺伝子の cDNA クローンの単離

8 日間生育させたカウピーに 10 時間乾燥ストレスを与えた後単離したポリ A⁺ RNA を用いて cDNA ライブラリーを作製した。

まず、乾燥処理植物からの cDNA ライブラリーの調製を以下のようにして行った。植物体全体を回収し、根から土を穏やかに洗い落とした後、室温、湿度約 60%、弱光条件下 Whatman 3MM 濾紙上に 10 時間置くことで乾燥処理を行った。乾燥処理を施した植物から全 RNA を以前記載されていた方法で調製した (Nagy, F. et al., "Analysis of gene expression in transgenic plants". In Gelvin and Schilperoort (eds), "Plant Molecular Biology Manual, B4"., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.1-29, 1988)。文献 (Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) に従って、全 RNA をオリゴdT セルロースカラムに 2 回通してポリ A⁺ RNA を調製した。カラムにアプライした RNA の約 2% がポリ A⁺ RNA 分画として回収された。ポリ A⁺ RNA から cDNA Synthesis System Plus (Amersham Pharmascia Biotech) を用いて 2 本鎖 cDNA を合成した。cDNA Cloning System (Amersham Pharmascia Biotech) を用いて cDNA から cDNA ライブラリーを作製した。

【 0 0 4 8 】

ストレスを与えていないカウピーから単離したポリ A⁺ RNA から調製した cDNA と、10 時間乾燥ストレスを与えた植物から単離したポリ A⁺ RNA から調製した cDNA とを用いて、上記の cDNA ライブラリーのディファレンシャルスクリーニングを行った。文献 (Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) に従って、プラークハイブリダイゼーションを行い、cDNA ライブラリーから 1×10^4 プラークをスクリーニングした。

【0049】

その結果、10時間乾燥ストレスを与えたカウピー由来の $[^{32}\text{P}]$ ラベルしたcDNAでより強いハイブリダイズシグナルが得られるブランクを得た。ファージクローンから *in vivo* でプラスミドを切り出し、大腸菌に形質転換した。得られたプラスミドは、制限酵素地図と各cDNA断片の境界部の配列により解析した。この解析によるcDNAをグループ分けを通して、CPRD (CowPea Responsive to Dehydration) 65と名付けたcDNAクローンを同定することができた。

【0050】

CPRD65クローンに対応する遺伝子の発現が乾燥処理により誘導されるかを、ノーザンブロットハイブリダイゼーションにより解析した。8日目の植物体を土から引き出し、最大12時間までの様々な時間乾燥処理した。コントロールとして、同様のカウピーをいったん土から引き出し、すぐによく水を含む土に植え戻した。乾燥処理植物とコントロール植物から全RNAを単離し、ノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。

【0051】

全RNAをNagyらの方法 (Nagy, F. et al., "Analysis of gene expression in transgenic plants". In Gelvin and Schilperoort (eds), "Plant Molecular Biology Manual, B4"., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.1-29, 1988) に従って単離し、ホルムアルデヒドを含む 1%アガロースゲルで分離しナイロンフィルターに転写した (Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。ナイロンフィルターは $[^{32}\text{P}]$ ラベルしたCPRD65 cDNA断片と 50% ホルムアミド、5×SSC、25mM リン酸ナトリウムバッファー (pH6.5)、10×Denhardt溶液、および 250 $\mu\text{g/ml}$ の変性サケ精子DNA中で42℃でハイブリダイズさせた。0.1×SSC、0.1% SDSで60℃で15分の洗浄を2回行い、オートラジオグラフィーを行った。

【0052】

図1は、CPRD65遺伝子の乾燥処理に対する発現誘導のタイムコースを表す。CPRD65の発現は、乾燥ストレスにより有意に上昇することが判明した。CPRD65に対

応する mRNA は乾燥処理を始めて 2 時間以内に蓄積が認められた。

【 0 0 5 3 】

10 時間乾燥処理したカウピーは萎れたが、これらの萎れた植物をよく水をやった土に戻す（再吸水処理）と 4 時間以内に萎れから回復した。再吸水処理に伴って、CPRD65 mRNA のレベルは減少した（図 1）。CPRD65 遺伝子は、乾燥処理により転写が誘導され、再吸水処理により減少するという、乾燥ストレスに対する典型的かつ有意な応答を示した。このことから、CPRD65 遺伝子は乾燥耐性に関与していることが示唆された。

【 0 0 5 4 】

〔実施例 2〕 CPRD65 cDNA のシーケンス解析

実施例 1 で単離された CPRD65 cDNA 断片は全長ではない可能性が考えられたため、CPRD65 の部分 cDNA をプローブにして同じ cDNA ライブラリーを再度スクリーニングして全長 cDNA（配列番号：11）を単離した。CPRD65 の全長 cDNA クローンがコードするアミノ酸配列（配列番号：12）を図 2 に示す。全長 CPRD65 cDNA は 2432bp からなり、125bp の 5'-flanking region（5'-隣接領域）と 486bp の 3'-flanking region（3'-隣接領域）を有する。3'-flanking region には、ポリアデニレーションコンセンサス配列（AATAAA）が 1 つ見出された。この配列は、612 アミノ酸のポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを持っており、予想される蛋白質の分子量は 67.6kDa と計算された。CPRD65 蛋白質の予想されるアミノ酸配列を蛋白質データベースと比較したところ、図 2 に示すように、トウモロコシ（*Zea mays*）の VP14（61%）（Schwartz, S.H. et al., Science. 276: 1872-1874, 1997）およびトマト（*Lycopersicon esculentum*）のネオザンチン開裂酵素（69%）（Burbidge, A. et al., J. Exp. Bot., 47: 2111-2112, 1997; Burbidge, A. et al., Plant J., 17: 427-431, 1999）と高いホモロジーを有することが判明した。VP14 蛋白質と同様、予想される CPRD65 蛋白質は N 末領域にトランジットポリペプチドを有していると思われた。CPRD65、VP14、およびトマトのネオザンチン開裂酵素の N 末の配列の類似性は低い、構造的な類似性を有している。

【 0 0 5 5 】

【実施例 3】 CPRD65 遺伝子のゲノムサザンブロット解析

カウピーの CPRD65 関連遺伝子を解析するため、ゲノムサザンブロットハイブリダイゼーションを 2 つのストリンジェンシーの条件で行った（図 3）。

【0 0 5 6】

ゲノムサザン解析は文献記載の方法に従った（Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989）。10 μ g のゲノム DNA を制限酵素で切断し、1% アガロースゲルで分離後ナイロンフィルターに転写した。フィルターは [32 P] ラベルした断片と 30% ホルムアミド、6 \times SSC、5 \times Denhardt 溶液、および 100 μ g/ml の変性サケ精子 DNA 中で 42 $^{\circ}$ C でハイブリダイズさせた。0.1 \times SSC、0.1% SDS で 60 $^{\circ}$ C で 15 分の洗浄を 2 回（B）、または 0.5 \times SSC、0.5% SDS で 37 $^{\circ}$ C で 15 分の洗浄を 2 回（A）を行い、オートラジオグラフィーを行った。

【0 0 5 7】

CPRD65 cDNA は、その塩基配列から、内部に EcoRI と XbaI の制限酵素部位がなく、HindIII の制限酵素部位が近接した 2 箇所に確認される。CPRD65 cDNA をプローブに使ったハイブリダイゼーションの結果、EcoRI または XbaI の切断に対し 1 本のバンドが、HindIII 切断に対し 2 本のバンドが検出された。上記（A）のストリンジェンシー条件では、さらに薄いバンドが何本か検出された。これらの結果は、CPRD65 遺伝子は、関連遺伝子と共に小さな遺伝子ファミリーを形成していることを示唆している。

【0 0 5 8】

【実施例 4】 CPRD65 遺伝子のノーザンブロット解析

様々な環境ストレスが CPRD65 の発現に及ぼす影響を調べた。高塩、ABA、および水処理は、乾燥処理と同様に植物を土から引き出し、水耕法により、それぞれ、250mM NaCl、100 μ M ABA、および脱イオン水を含む溶液で生育させた。高温および低温ストレス処理は、鉢植した植物をそれぞれ、40 $^{\circ}$ C および 4 $^{\circ}$ C のインキュベーターに移して行った。それぞれの場合で、植物のストレス処理は 0、1、2、5、10、および 24 時間行った。処理終了後、速やかに処理した植物を液体窒素中で凍結させた後、RNA を単離しノーザンブロット解析を行った。

その結果、この遺伝子の発現は高塩濃度条件において強く誘導されるが、低温または高温ストレスによっては誘導されないことが判明した（図4A）。CPRD65遺伝子の誘導は、ABA処理や水処理によっては検出されなかった。

【0059】

乾燥ストレスによるCPRD65遺伝子発現に組織特異性が存在するかを調べるため、標準条件と乾燥条件下で葉、茎、または根から全RNAを調製し、ノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った（図4B）。乾燥処理により、CPRD65遺伝子の転写産物は茎と葉で強く誘導されたが、根での誘導量は顕著ではなかった。

【0060】

【実施例5】 バクテリアで発現させたCPRD65蛋白質の酵素活性

CPRD65遺伝子から予想されるアミノ酸配列は、トウモロコシのVP14遺伝子がコードするネオザンチン開裂酵素のアミノ酸配列と高いホモロジーを有している（図2）。CPRD65遺伝子がネオザンチン開裂酵素をコードしているのかを調べるため、大腸菌で発現させた組換えCPRD65蛋白質の生化学的特性を分析した。CPRD65のコード領域のDNA断片をPCRで増幅し、pGEX4T-1 (Pharmacia) のGST遺伝子に *in frame* で融合させ、キメラプラスミド pGST-CPRD65 を下記のように構築した。

【0061】

CPRD65蛋白質をコードするDNAを、プライマー 5'-ATTGAATTCATGCCTTCAGCTTCAAAC-3'（配列番号：19）および 5'-ATTGGATCCCAAAAGCTACACGCTGGTCCCC-3'（配列番号：20）を用いてPCRにより増幅した。得られたPCR断片をpBluescript II SK+ ベクターのEcoRV部位に挿入した。PCRによりDNA配列に変異が生じていないか挿入したPCR断片の塩基配列を確認した。塩基配列に変異の認められないPCR断片をpBluescript II SK+ ベクターから制限酵素（EcoRI、XhoI）を用いてDNA断片として単離し、このDNA断片を pGEX4T-1 (Amersham Pharmacia Biotech) のEcoRI、XhoI部位に挿入し、pGST-CPRD65を構築した。大腸菌 JM109 を pGST-CPRD65 または pGEX4T-1 で形質転換し、L培地で37℃で培養した。OD₆₀₀ が約0.5になったところでイソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）を加え、さらに17℃で12時間培養を続けた。細胞を回収し、洗浄した後、抽出バッファー [10mM

Tris-HCl (pH8.0), 5mM MgCl_2 , 5% glycerol, 0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), および 0.1mM dithiothreitol (DTT)] に懸濁した。融合蛋白質の精製とトロンピン切断の方法は、GST遺伝子融合システム (Amersham Pharmacia Biotech) の説明書に従った。蛋白質濃度はプロテインアッセイキット (Bio-Rad) を使って決定した。

【 0 0 6 2 】

上記のように大腸菌で GST-CPRD65 融合蛋白質を過剰発現させ、粗細胞抽出物からグルタチオンセファロース4Bを用いて蛋白質を精製した。この精製GST-CPRD65組換え蛋白質が、シス-ネオザンチン (cis-neoxanthin)、トランス-ビオラザンチン (trans-violaxanthin)、およびシス-ビオラザンチン (cis-violaxanthin) を切断し、ザントキシンを生成するかを調べた。

【 0 0 6 3 】

ネオザンチン開裂酵素活性のアッセイ方法は以前記載されている方法に従った (Schwartz, S.H. et al., Science. 276: 1872-1874, 1997)。シス-ネオザンチンとトランス-ビオラザンチンはハウレンソウ葉より調製した。シス-ビオラザンチンはオレンジの皮から調製した。反応液 (100 μ l) は 100mM Bis-Tris (pH6.7), 0.05% Triton X-100, 10mM アスコルビン酸, 5mM FeSO_4 , および 蛋白質試料を含む。室温で1時間反応させた。反応後、水 1ml を加え、n-ヘキサン (1ml \times 2)、次に酢酸エチル (1ml \times 2) で抽出した。n-ヘキサン画分を濃縮し、Nucleosil 5 C₁₈ (150mm長, 内径8mm)カラムによりHPLC分析を行った。カラムは、溶媒A (85% エタノール) と溶媒B (クロロホルム:メタノール=1:1) のリニアグラディエントで、流速 1.5ml/min で溶出させた。溶媒Bの濃度を25分かけて10%から50%に増加させ、5分間50%に維持した。溶出液はUV検出器で440nmの吸収をモニターした。酢酸エチル画分を、Nucleosil 5 C₁₈ (150mm長, 内径8mm)カラムを用いたHPLCにより精製した。カラムは、50%の水メタノールで流速 1.5ml/min で溶出させ、UV検出器で260nmの吸収をモニターした。ザントキシシン (xanthoxin) 画分を集め、GC-MS分析を行った。各段階ではできる限り試料に光が当たらないようにした。

【 0 0 6 4 】

GC-MS分析は以下のようにして行った。5890ガスクロマトグラフ (Hewlett Packard) を装備したAUTOMASSマスペクトロメーター (日本電子) を分析に用いた。分析条件を以下に示す。イオン化, EI 70eV; カラム, DB-5 (15m長; 内径0.25 mm; フィルム厚 0.25 μ m; J&W Scientific); キャリアガス, He (1ml min⁻¹), 注入温度, 250°C; 伝達経路温度, 250°C; 初期加熱温度, 80°C。注入1分後に開始し、加熱温度を 30°C min⁻¹ の速度で200°Cまで増加させ、さらに 5°C min⁻¹ の速度で230°Cまで増加させた。

【 0 0 6 5 】

図5に示したように、HPLC分析によって、GST-CPRD65蛋白質とシス-ネオザンチンの混合反応により、予想されるC25産物とザントキシンが検出された。ザントキシンの生成は、GC-MS分析でザントキシンに特徴的なイオンを観察することによって確認した。イオンとそれらの相対強度を以下に示す: m/z 250 (4), 168 (32), 149 (77), 107 (61), および 95 (100)。ザントキシンおよびC25産物は、トランス-ピオラザンチンでは生成しなかった (データ省略)。トロンピンによりGST-CPRD65組換え蛋白質をGST部分とCPRD65部分に分離しても、これらの結果は変わらなかった。

【 0 0 6 6 】

【実施例6】 CPRD65蛋白質のN末領域がシロイヌナズナから調製したプロトプラスト中でトランジットペプチドとして機能するかの解析

CPRD65蛋白質のN末領域は、葉緑体へのターゲティングに関与するトランジットペプチドの典型的な構造的特徴を有している。CPRD65蛋白質のこの構造的特徴から、CPRD65蛋白質は葉緑体を含む色素体に局在することが示唆される。このN末領域がトランジットペプチドとしての役割を有するかを調べるため、CaMV 35S プロモーターおよびクラゲ (*Aequorea victoria*) の合成緑色蛍光蛋白質 (sGFP) (Chiu, W. et al., Curr. Biol., 6: 325-330, 1996) 遺伝子の間にCPRD65蛋白質のN末領域 (1-148) がコードされた構造を有する 35S::CPRD65N-sGFP キメラ遺伝子を構築した。

【 0 0 6 7 】

CPRD65蛋白質のN末端ペプチド (1-148アミノ酸) に対応するDNAを、プライマ

— 5'-ATATATCTAGAATGCCTTCATCAGCTTCAAACACTTGG-3' (配列番号: 21) および 5'-ATATAGGATCCCTCCGGCACCGGCGCGAAGTTCCCG-3' (配列番号: 22) を用いたPCRにより増幅した。PCR断片を pBluescript II SK+ ベクターに挿入し、PCRによる配列の変異がないことを確認した。一過的発現ベクター (Chiu, W. et al., *Cur. Biol.*, 6: 325-330, 1996) の35SプロモーターとsGFP遺伝子の間にDNA断片を挿入した。調製方法、DNAトランスフェクション、およびシロイヌナズナプロトプラストのインキュベーションは、以前記載されたように行った (Abel, S. and Theologis, A., *Plant J.*, 5: 421-427, 1994)。

【0068】

35S::CPRD65N-sGFP 融合構築物およびそのコントロール構築物 (35S::sGFP) を、DNAトランスフェクション法によりシロイヌナズナから調製したプロトプラストへ導入した (Abel, S. and Theologis, A., *Plant J.*, 5: 421-427, 1994)。形質転換2～4日後に蛍光顕微鏡でプロトプラストを観察した。図6に示したように、35S::CPRD65N-sGFPをプロトプラストで一過的に発現させた場合、その蛍光は色素体に局在していた。一方、35S::sGFP構築物を導入した場合は、蛍光は色素体ではなく、主に細胞質に検出された。これらの結果は、CPRD65蛋白質のN末端領域はCPRD65蛋白質を色素体にターゲティングするトランジットペプチドとして機能することを示唆している。CPRD65蛋白質は色素体に局在し、色素体中でABAを産生するために機能していると予想される。

【0069】

[実施例7] 生育8日目のカウピーの乾燥ストレスによるABAの蓄積

生育8日目のカウピーに乾燥ストレスを与え、内生ABAレベルの蓄積を測定した。

試料を液体窒素中でホモジナイズし、水-メタノール (20-80%) で2回抽出した。 $[^2\text{H}_3]$ ABA を加えた後、抽出物を濃縮し、標準的な溶媒分画を行い酢酸エチル可溶性酸性画分を得た。Bond Elut カートリッジ (C_{18} およびDEA, Varian) を用いて以前記載された方法に従って精製を行った (Wijayanti, L. et al., *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 1533-1535, 1995)。乾燥させていない植物から精製した試料は Senshu Pak ODS-2101-N カラム (100mm長, 内径6mm) (Senshu Sc

ientific Co.) を用いてHPLC分析を行った。分析条件は以前に記載したものと同様にした (Wijayanti, L. et al., Biosci. Biotech. Biochem. 59: 1533-1535, 1995)。精製された試料は、エーテル含有ジアゾメタンでメチル化し、GC-SIM 分析を行った。

【 0 0 7 0 】

図 7 に示すように、乾燥処理 2 時間以内にABAの蓄積が始まった。10時間乾燥処理した植物のABAレベルはストレスを与えないコントロール植物に比べ140倍に高まった。CPRD65 mRNA の蓄積のタイミングはABA mRNA の蓄積のタイミングよりも早かった (図 7)。

【 0 0 7 1 】

CPRD65遺伝子の発現は乾燥ストレスにより葉および茎で強く誘導されたが、根での誘導は僅かであった (図 4 B)。乾燥ストレス下でのCPRD65の発現と内生ABAの蓄積との関係を調べた。生育 8 日目のカウピーを葉、茎、および根に分け、それぞれを乾燥処理した。これらの器官の内生ABAレベルを、乾燥処理の前後で測定した。図 8 に示したように、内生ABA量は乾燥ストレスにより、葉および茎で劇的に蓄積が認められたが、根では僅かしか蓄積しなかった。図 4 Bおよび 8 に示したように、乾燥ストレスにおけるABAの組織特異的な蓄積パターンは、CPRD65遺伝子の発現パターンと一致していた。

【 0 0 7 2 】

【実施例 8】 カウピー葉のザントフィル (xanthophyll) 分析

CPRD65蛋白質の基質を検索するため、カウピー葉のザントフィルを分析した。

試料をアセトンで 2 回抽出し、濃縮した後、80%メタノール (1ml) に溶解し、Bond Elut C₁₈ カラムにロードした。80%メタノール4mlを加えてカラムを洗浄し、5mlのメタノール-水-クロロホルム (71:9:20) でザントフィルを溶出した。溶出液を濃縮し、Nucleosil 5 C₁₈ と Senshu Pak Silica-2551-S (250mm長、内径6mm)のカラムを用いてHPLC分析を行った。ODS-HPLCの条件は上記と同一である。シリカHPLCでは、流速は 1.5ml/min とし、溶媒Aは酢酸エチル-n-ヘキサン (1:1)、溶媒Bは酢酸エチルを用いて、溶媒Bを30分かけて10%から100%までリニアに勾配をつけた。可視光とUVのスペクトル分析によりザントフィルを同定し

た。

【 0 0 7 3 】

可視光とUVの光学スペクトル分析により、トランス-ネオザンチン、トランス-ピオラザンチン、シス-ネオザンチンがカウピー葉の主要なザントフィルとして、シス-ピオラザンチンが微量成分として検出された（データ省略）。トランス-ネオザンチン、トランス-ピオラザンチンおよびシス-ネオザンチンの内生量は、正常生育条件と乾燥条件下において大きな変化は認められなかった。

【 0 0 7 4 】

以上のように、カウピーの乾燥誘導性遺伝子 CPRD65 はネオザンチン開裂酵素をコードしており、その産物は色素体に局在していることが判明した。CPRD65遺伝子は、乾燥や高塩条件下において、主に葉と茎で強く誘導される。乾燥条件下は、葉と茎にABAが高度に蓄積され、それはCPRD65遺伝子の発現と同様のパターンを示す。これらの結果は、CPRD65蛋白質が、カウピーの乾燥ストレスにおけるABA生合成に主に関与する酵素であることを強く示唆している。

【 0 0 7 5 】

[実施例 9] ネオザンチン開裂酵素遺伝子のホモログをコードするアラビドプシスcDNAクローンの単離

CPRD65をプローブにして、アラビドプシスのcDNAライブラリー (Abe, H. et al., Plant Cell, 9:1859-1868, 1997) をスクリーニングした。その結果、強いハイブリダイゼーションシグナルを示す多数のプラークが得られた。これらのプラークからファージクローンを単離し、制限酵素でcDNA領域を切り出して pBluscript SK+ 中に挿入し、大腸菌を形質転換した。DNA配列の解析により、これらのクローンは1つのグループに分類された。これをAtNCED3と名付けた。AtNCED3はネオザンチン開裂酵素をコードするCPRD65と有意な相同性を示した（図9）。AtNCED3 cDNAの塩基配列を配列番号：5に、AtNCED3蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：6に示す。

【 0 0 7 6 】

[実施例 10] AtNCED1, 2, 4, 5 の単離及び系統樹解析

CPRD65 及び AtNCED3 の塩基配列を用いてDNAデータベースを検索した結果、

高い相同性が認められた配列を4個見出した (Ac. No. AL021713, AL021687, AJ005813, AB028621)。

AL021713の配列上に存在する相同性の高い遺伝子を単離するために、gDNAを鋳型にPCR法 (プライマー5'-CCCGGGATCCCTCAAGCCTCTCTATACCG-3' / 配列番号: 23、5'-CCCGGGATCCTTTATACGGATTCTGAGGGAG-3' / 配列番号: 24) で目的遺伝子断片を増幅した。その断片をプローブとしてgDNAライブラリー (クローンテック社) から目的遺伝子を含むクローンを単離し再度PCR法 (プライマー5'-CCCGGGATCCCTCAAGCCTCTCTATACCG-3' / 配列番号: 23、5'-CCCGGGATCCTTTATACGGATTCTGAGGGAG-3' / 配列番号: 24) で遺伝子を増幅しpBluescript II SK+ (Stratagene) のEcoRVサイトにクローニングしDNA塩基配列を決定した。この遺伝子をAtNCED1とした。AtNCED1 cDNAの塩基配列を配列番号: 1に、AtNCED1蛋白質のアミノ酸配列を配列番号: 2に示す。

【0077】

AL021687の配列上に存在する相同性の高い遺伝子を単離するためにgDNAを鋳型にPCR法 (プライマー5'-ATTGAATTCATGGACTCTGTTTCTTCTTCC-3' / 配列番号: 25、5'-ATTGAATTCTTAAAGCTTATTAAGGTCACCTTCC-3' / 配列番号: 26) で目的遺伝子断片を増幅した。その断片をプローブとしてgDNAライブラリーから目的遺伝子を含むクローンを単離し再度PCR法 (プライマー5'-ATTGAATTCATGGACTCTGTTTCTTCTTCC-3' / 配列番号: 25、5'-ATTGAATTCTTAAAGCTTATTAAGGTCACCTTCC-3' / 配列番号: 26) で遺伝子を増幅しpBluescript II SK+ (Stratagene) のEcoRVサイトにクローニングしDNA塩基配列を決定した。この遺伝子をAtNCED2とした。AtNCED2 cDNAの塩基配列を配列番号: 3に、AtNCED2蛋白質のアミノ酸配列を配列番号: 4に示す。

【0078】

AJ005813の配列上に存在する相同性の高い遺伝子を単離するためにgDNAを鋳型にPCR法 (プライマー5'-AAGAATTCATGGCGGAGAACTCAGTGATGGCAGC-3' / 配列番号: 27、5'-AAAAGAATTCGGCTTATATAAGAGTTTGTTCCTGG-3' / 配列番号: 28) で目的遺伝子断片を増幅した。その断片をプローブとしてcDNAライブラリーから目的遺伝子を含むクローンを単離し再度PCR法 (プライマー5'-AAGAATTCATGGCGGAGAACT

CAGTGATGGCAGC-3' / 配列番号 : 2 7、5'-AAAAGAATTCGGCTTATATAAGAGTTTGTTCCTGG-3' / 配列番号 : 2 8) で遺伝子を増幅し pBluescript II SK+ (Stratagene) の EcoRV サイトにクローニングし DNA 塩基配列を決定した。この遺伝子を AtNCED4 とした。AtNCED4 cDNA の塩基配列を配列番号 : 7 に、AtNCED4 蛋白質のアミノ酸配列を配列番号 : 8 に示す。

【 0 0 7 9 】

AB028621 の配列上に存在する相同性の高い遺伝子を単離するために P1 クローン MUJ8 の DNA を単離し PCR 法 (5'-CGGGATCCATGCAACACTCTCTTCGTTCTGATCTTCTTC-3' / 配列番号 : 2 9、5'-CGGGATCCTCAGAAACTTGTTCTTCAACTGATTCTCGC-3' / 配列番号 : 3 0) で遺伝子を増幅し pBluescript II SK+ (Stratagene) の EcoRV サイトにクローニングし DNA 塩基配列を決定した。この遺伝子を AtNCED5 とした。AtNCED5 cDNA の塩基配列を配列番号 : 9 に、AtNCED5 蛋白質のアミノ酸配列を配列番号 : 1 0 に示す。

【 0 0 8 0 】

AtNCED1~5 のアミノ酸配列のアライメントを図 1 0 に示す。各配列から予想されるアミノ酸配列とデータベース上にある配列の関係を調べるため系統樹解析を行った (図 1 1) 。系統樹は、遺伝子解析ソフトである GeneWorks (Intelligentics, Inc.) を用いて作製した。アルゴリズムは UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean ; 分子進化遺伝学、根井正利著、五條堀孝、斎藤成也共訳、培風館、p252-256) を使用した。 【 0 0 8 1 】

[実施例 1 1] AtNCED 遺伝子のノーザンブロット解析

同定した各 AtNCED 遺伝子の発現に関して、様々な環境ストレスが及ぼす影響をノーザンブロット解析により調べた。

【 0 0 8 2 】

各ストレス処理には、寒天プレートにて 3 週間栽培した植物体を用いた。乾燥ストレスは、寒天培地から植物体を引き抜き濾紙の上で風乾させた (相対湿度 50 %) 。塩ストレス、ABA 処理、コントロールとしての水処理は、それぞれ 250mM NaCl 溶液、100 μ M ABA 溶液、蒸留水を入れたシャーレに根だけが浸かるように引き抜いた植物体をシャーレの中に置きシャーレにフタをして室温にて一定時間放

置した。低温ストレス及び高温ストレスは寒天プレートごとそれぞれ4℃、及び40℃の恒温培養器に一定時間放置した。

【 0 0 8 3 】

上記の環境ストレス処理を行った植物体を液化窒素中で破碎し、全RNAを抽出 (Nagy, F., Kay, S. A. and Chua, N. -H. (1988) Analysis of gene expression in transgenic plants. In Gelvin and Schilperoort, eds, Plant Molecular Biology Manual, B4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 1-29) し、1%のアガロースゲル中で1レーン当たり20 μ gずつ電気泳動した。電気泳動後のゲルからRNAをナイロンメンブレンに転写し、 32 PでラベルしたcDNAプローブを用いてノーザンハイブリダイゼーションをおこなった (Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.)。

【 0 0 8 4 】

その結果、AtNCED3 遺伝子は乾燥、高塩濃度、および低温条件で発現が強く誘導されることが判明した。高温条件では誘導は見られなかった。また、ABA処理または水処理では、AtNCED3遺伝子の発現誘導は検出されなかった (図 1 2)。

【 0 0 8 5 】

【実施例 1 2】 バクテリアで発現させた AtNCED 蛋白質の酵素特性

AtNCED3遺伝子から予想されるアミノ酸配列は、ネオザンチン開裂酵素をコードするカウピーの CPRD65 遺伝子のものと高いホモロジーを有している (図 9)。AtNCED3 遺伝子がネオザンチン開裂酵素をコードしているかを調べるため、大腸菌で発現させた組換え AtNCED3 蛋白質の生化学的な特性を解析した。

【 0 0 8 6 】

プライマー (5'-ATTGAATTCATGGCTTCTTTCACGGCAACGGC-3' / 配列番号: 3 1、および5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' / 配列番号: 3 2) を用いて、クローニングした AtNCED3 cDNA を鋳型にAtNCED3蛋白質をコードするDNAをPCRで増幅した。得られたPCR断片をpBluescript II SK+ (Stratagene)のEcoRVサイトにクローニングした。PCRによりDNA塩基配列に変異が導入されていないかを決定した。変異の認められないDNA断片を、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 遺伝子を含む

pGEX4T-1 (Amersham Pharmacia Biotech) のEcoRIサイトにフレームが合うようにクローニングし、キメラプラスミド pGST-AtNCED3 を構築した。大腸菌JM109株を pGST-AtNCED3 または pGEX4T-1 で形質転換し、L培地中で37℃で培養した。OD₆₀₀ が約0.5になったところで isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を加え、17℃で12時間培養を続けた。大腸菌を回収し、洗浄後、抽出バッファー [10 mM Tris-HCl (pH8.0), 5 mM MgCl₂, 5% glycerol, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), および 0.1 mM dithiothreitol (DTT)] に懸濁した。融合蛋白質の精製およびトロンピンによる切断は、glutathione-Sepharose 4B [the GST gene fusion system (Amersham Pharmacia Biotech)] を用いてその説明書に従って行った。蛋白質の濃度は protein assay kit (Bio-Rad, CA, USA) を用いて決定した。

【 0 0 8 7 】

ネオザンチン開裂酵素活性のアッセイを行った結果、GST-AtNCED3蛋白質とシス-ネオザンチンを含む反応液中に、予想される C25産物とザントキシンが検出されたことから、AtNCED3蛋白質はネオザンチン開裂活性を有することが確認された。同様の実験により、AtNCED1およびAtNCED5にもネオザンチン開裂活性が検出された。

【 0 0 8 8 】

[実施例 1 3] トランスジェニック体の作製

供試体としてシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Columbia) をもちいた。培養土を入れた直径9cmのプラスチック製ポットに野生型シロイヌナズナを播種し、22℃、16時間日長の条件下で6週間栽培したのち形質転換に用いた。

【 0 0 8 9 】

カナマイシン耐性マーカーとカリフラワーモザイクウィルスの35SプロモーターをもつpBE2113ベクター (Mitsuhara, I. et al. Plant Cell Physiol. 37: 49-59 (1996)) からGUSレポーター遺伝子を無くしたベクター (pBE2113NOT) を作製し、シロイヌナズナから単離したAtNCED3のcDNAをそのBamHIサイトに正方向 (センス方向) または逆方向 (アンチセンス方向) につないだ。得られたベクターを

三者混合法により土壌細菌 (Agrobacterium tumefaciens strain GV3101 (pMP90)) に導入した。目的の遺伝子を導入した土壌細菌をカナマイシン (Km) 耐性により選択し、減圧浸潤法 (Bechtold, N. et al. C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sci. 316, 1194-1199 (1993)) をもちいて野生型シロイヌナズナに感染させた。感染後の植物体から乾燥種子を採取し、カナマイシンを添加した寒天プレートに播種して栽培し形質転換第1世代個体 (T1) を選抜した。形質転換体第1世代から得られた形質転換体第2世代 (T2) の種子をカナマイシン添加プレートに播種し、カナマイシン耐性を示すものから第3世代 (T3) の種子を採取した。さらに、第3世代種子を同様にカナマイシン添加プレートに播種し、すべての種子が薬剤耐性を示すものをT3ホモのラインとして以後の実験にもちいた。最終的にAtNCED3遺伝子のセンス、アンチセンス形質転換体を2系統ずつ単離した。

【 0 0 9 0 】

〔実施例 1 4〕 形質転換体におけるAtNCED3遺伝子の発現の評価

シロイヌナズナ野生株及びAtNCED3遺伝子のシロイヌナズナ形質転換株におけるAtNCED3遺伝子の発現をノーザンハイブリダイゼーション法で評価した。

【 0 0 9 1 】

形質転換体におけるAtNCED3遺伝子の発現解析には、1ヶ月栽培した植物体を用いた。乾燥ストレスは、植物体を引き抜き濾紙の上で風乾させた（相対湿度50%）。上記の環境ストレス処理を行った植物体を液化窒素中で破碎し、全RNAを抽出 (Nagy, F., Kay, S. A. and Chua, N. -H. (1988) Analysis of gene expression in transgenic plants. In Gelvin and Schilperoort, eds, Plant Molecular Biology Manual, B4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 1-29) し、1%のアガロースゲル中で1レーン当たり20 μ gずつ電気泳動した。電気泳動後のゲルからRNAをナイロンメンブレンに転写し、 32 PでラベルしたRNAプローブを用いてノーザンハイブリダイゼーションをおこなった (Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.)。

【 0 0 9 2 】

その結果、乾燥ストレスより前において、野生株では AtNCED3 遺伝子の発現が認められないが、センス植物体ではすでに AtNCED3 遺伝子の発現が認められた。一方、乾燥処理を行うと、野生株では AtNCED3 遺伝子の発現の乾燥誘導が認められたが、アンチセンス植物では乾燥ストレス処理を行っても AtNCED3 遺伝子の発現は認められなかった（図 1 3）。

【 0 0 9 3 】

[実施例 1 5] 形質転換体における内生 ABA 量の評価

シロイヌナズナ野生株及び AtNCED3 遺伝子のシロイヌナズナ形質転換株における内生 ABA 量の測定をした。

【 0 0 9 4 】

シロイヌナズナ野生株及び形質転換体における内生 ABA 量は、1 ヶ月栽培した植物体を用いた。試料を液体窒素中でホモジナイズし、水-メタノール（20-80%）で2回抽出した。 $[^2\text{H}_3]$ ABA を加えた後、抽出物を濃縮し、標準的な溶媒分画を行い酢酸エチル可溶酸性画分を得た。Bond Elut カートリッジ (C_{18} および DEA, Varian) を用いて以前記載された方法に従って精製を行った (Wijayanti, L. et al., Biosci. Biotech. Biochem. 59: 1533-1535, 1995)。乾燥させていない植物から精製した試料は Senshu Pak ODS-2101-N カラム（100mm 長，内径 6mm）（Senshu Scientific Co.）を用いて HPLC 分析を行った。分析条件は以前に記載されたものと同様にした (Wijayanti, L. et al., Biosci. Biotech. Biochem. 59: 1533-1535, 1995)。精製された試料は、エーテル含有ジアゾメタンでメチル化し、GC-SIM 分析を行った。

【 0 0 9 5 】

その結果、野生株に対してセンス植物体では ABA 量の上昇が、アンチセンス植物体では ABA 量の減少が認められた（図 1 4）。

【 0 0 9 6 】

[実施例 1 6] 乾燥耐性の評価結果

得られた形質転換植物の種子を、栄養塩類を含む寒天プレート (Valvekens, D. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5536-5540 (1988)) に播種し上記の栽培条件下で2週間栽培して下記の実験に供した。

上記植物体を土（バーミキュライト：パーライト＝1：1）を入れた直径9cmのプラスチック製ポットに4個体ずつ移植し、22℃、16時間日長の条件下で栽培した。播種3週間後（移植の2週間後）に植物体が入ったポットを水やりを止めることによって無灌水状態にし、自然に植物体に乾燥ストレスを与えた。無灌水処理開始14日後、17日後に写真撮影した。無灌水処理開始後14日にはAtNCED3遺伝子をアンチセンス方向に導入した植物体は枯れた（図15）。これに対し、センス方向に導入した形質転換植物体では、萎れはほとんど見られなかった。無灌水処理開始17日後には野生株も枯れたが、センス方向に導入した形質転換植物体は乾燥に対する有意な耐性を示した（図16）。

【0097】

【発明の効果】

本発明により、ストレス耐性が上昇または低下した植物を作出することが可能となった。ストレス耐性が上昇した植物は、これまで生育が不可能であった厳しい環境の土地でも生育することができる。また、ストレス耐性が低下した植物は、雑草などに応用することができる。本発明の方法を農作物に適用すれば栽培面積の拡大と収量の増大が期待できる。

【0098】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> Transgenic plants introduced with neoxanthin
cleavage enzyme genes

<130> R3-102DP1

<140>

<141>

<150> JP 2000-010056

<151> 2000-01-13

<160> 32

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1752

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1752)

<400> 1

atg gtt tct ctt ctt aca atg ccg atg agt ggt ggt att aaa aca tgg 48

Met Val Ser Leu Leu Thr Met Pro Met Ser Gly Gly Ile Lys Thr Trp

1 5 10 15

cct caa gcc caa att gat ttg ggt ttt agg ccc att aaa aga caa ccg 96

Pro Gln Ala Gln Ile Asp Leu Gly Phe Arg Pro Ile Lys Arg Gln Pro

20 25 30

aag gtt att aaa tgc acg gtg cag atc gac gta acg gaa tta acc aaa 144

Lys Val Ile Lys Cys Thr Val Gln Ile Asp Val Thr Glu Leu Thr Lys

35 40 45

aaa cgc caa tta ttt aca ccc aga acc acc gct act ccg ccg cag cat 192

Lys Arg Gln Leu Phe Thr Pro Arg Thr Thr Ala Thr Pro Pro Gln His

50

55

60

aat cct ctc cgg cta aac atc ttc cag aaa gcg gcg gcg att gcg atc 240

Asn Pro Leu Arg Leu Asn Ile Phe Gln Lys Ala Ala Ala Ile Ala Ile

65

70

75

80

gac gcg gct gag cgt gca tta atc tca cac gag caa gat tct cca ctt 288

Asp Ala Ala Glu Arg Ala Leu Ile Ser His Glu Gln Asp Ser Pro Leu

85

90

95

ccc aaa acc gct gat cca cgt gtt cag att gcc ggg aat tat tcc ccg 336

Pro Lys Thr Ala Asp Pro Arg Val Gln Ile Ala Gly Asn Tyr Ser Pro

100

105

110

gta ccg gaa tct tcc gtc cgg cga aac ctc acc gtc gaa gga aca atc 384

Val Pro Glu Ser Ser Val Arg Arg Asn Leu Thr Val Glu Gly Thr Ile

115

120

125

cct gac tgc att gac ggt gtt tat atc cgt aac ggc gcg aat ccg atg 432

Pro Asp Cys Ile Asp Gly Val Tyr Ile Arg Asn Gly Ala Asn Pro Met

130

135

140

ttt gag cca aca gct ggg cac cat tta ttc gac gga gac gga atg gtt 480

Phe Glu Pro Thr Ala Gly His His Leu Phe Asp Gly Asp Gly Met Val

145

150

155

160

cac gca gtt aaa ata acc aac ggt tca gct agc tac gca tgc cgg ttt 528
His Ala Val Lys Ile Thr Asn Gly Ser Ala Ser Tyr Ala Cys Arg Phe

165

170

175

aca aaa acc gag aga ttg gtt cag gaa aaa cga ttg ggt cga cca gtt 576
Thr Lys Thr Glu Arg Leu Val Gln Glu Lys Arg Leu Gly Arg Pro Val

180

185

190

ttc ccg aaa gca atc ggc gag ctt cac ggt cac tcg gga atc gca cgt 624
Phe Pro Lys Ala Ile Gly Glu Leu His Gly His Ser Gly Ile Ala Arg

195

200

205

ttg atg ctg ttt tac gca cgt ggg ctt tgt ggt ctg atc aac aac caa 672
Leu Met Leu Phe Tyr Ala Arg Gly Leu Cys Gly Leu Ile Asn Asn Gln

210

215

220

aac ggc gtc gga gta gca aac gcc ggt ttg gtt tac ttt aat aac cgg 720
Asn Gly Val Gly Val Ala Asn Ala Gly Leu Val Tyr Phe Asn Asn Arg

225

230

235

240

ctt tta gct atg tca gaa gac gat tta ccg tac caa tta aaa att act 768
Leu Leu Ala Met Ser Glu Asp Asp Leu Pro Tyr Gln Leu Lys Ile Thr

245

250

255

caa acc ggc gat ctc caa acc gtt gga cgt tac gat ttc gac ggt cag 816
Gln Thr Gly Asp Leu Gln Thr Val Gly Arg Tyr Asp Phe Asp Gly Gln

260

265

270

tta aaa tcc gca atg ata gct cac ccg aaa ctg gac ccg gtt acg aag 864

Leu Lys Ser Ala Met Ile Ala His Pro Lys Leu Asp Pro Val Thr Lys

275

280

285

gag ctt cac gcg tta agc tac gac gtc gtt aag aaa cct tac ctg aaa 912

Glu Leu His Ala Leu Ser Tyr Asp Val Val Lys Lys Pro Tyr Leu Lys

290

295

300

tac ttc aga ttc tcg cca gac ggc gtt aaa tcg ccg gaa ttg gag atc 960

Tyr Phe Arg Phe Ser Pro Asp Gly Val Lys Ser Pro Glu Leu Glu Ile

305

310

315

320

ccg ctc gaa act ccg acg atg att cac gat ttc gct ata acg gag aat 1008

Pro Leu Glu Thr Pro Thr Met Ile His Asp Phe Ala Ile Thr Glu Asn

325

330

335

ttt gtg gtg att cct gat caa caa gtc gtg ttc aag ctc ggc gag atg 1056

Phe Val Val Ile Pro Asp Gln Gln Val Val Phe Lys Leu Gly Glu Met

340

345

350

att tcc ggt aaa tct ccg gtt gtt ttc gac gga gaa aag gtt tcc cga 1104

Ile Ser Gly Lys Ser Pro Val Val Phe Asp Gly Glu Lys Val Ser Arg

355

360

365

ttg ggg ata atg ccc aag gac gcg aca gaa gct tct cag ata atc tgg 1152

Leu Gly Ile Met Pro Lys Asp Ala Thr Glu Ala Ser Gln Ile Ile Trp

370

375

380

gtg aac tct ccg gag acg ttc tgt ttt cat ctc tgg aat gca tgg gaa 1200

Val Asn Ser Pro Glu Thr Phe Cys Phe His Leu Trp Asn Ala Trp Glu

| | | | | |
|---|------|-----|-----|--|
| 385 | 390 | 395 | 400 | |
| tcg ccg gag acg gag gag att gtg gtg atc gga tcg tgt atg tcg ccg | 1248 | | | |
| Ser Pro Glu Thr Glu Glu Ile Val Val Ile Gly Ser Cys Met Ser Pro | | | | |
| 405 | 410 | 415 | | |
| gcg gat tca atc ttc aac gag aga gac gag agc ttg aga agc gtt ttg | 1296 | | | |
| Ala Asp Ser Ile Phe Asn Glu Arg Asp Glu Ser Leu Arg Ser Val Leu | | | | |
| 420 | 425 | 430 | | |
| tcg gag atc agg ata aac ctc aga aca cgt aaa acc acg cgt cgt tcg | 1344 | | | |
| Ser Glu Ile Arg Ile Asn Leu Arg Thr Arg Lys Thr Thr Arg Arg Ser | | | | |
| 435 | 440 | 445 | | |
| ttg ttg gtt aac gag gat gta aat tta gag att ggt atg gtt aac cgg | 1392 | | | |
| Leu Leu Val Asn Glu Asp Val Asn Leu Glu Ile Gly Met Val Asn Arg | | | | |
| 450 | 455 | 460 | | |
| aac cgg tta gga aga aaa acc cgg ttc gcg ttt ttg gct att gct tat | 1440 | | | |
| Asn Arg Leu Gly Arg Lys Thr Arg Phe Ala Phe Leu Ala Ile Ala Tyr | | | | |
| 465 | 470 | 475 | 480 | |
| cct tgg cca aaa gtt tcc ggt ttc gct aag gtc gat ctt tgc acc ggt | 1488 | | | |
| Pro Trp Pro Lys Val Ser Gly Phe Ala Lys Val Asp Leu Cys Thr Gly | | | | |
| 485 | 490 | 495 | | |
| gag atg aaa aaa tat att tac ggc ggt gag aaa tat ggc ggc gaa ccg | 1536 | | | |
| Glu Met Lys Lys Tyr Ile Tyr Gly Gly Glu Lys Tyr Gly Gly Glu Pro | | | | |
| 500 | 505 | 510 | | |

ttt ttc ttg ccc ggc aac tcc ggt aac ggc gaa gaa aat gaa gat gac 1584
Phe Phe Leu Pro Gly Asn Ser Gly Asn Gly Glu Glu Asn Glu Asp Asp

515

520

525

ggt tat ata ttt tgt cac gtt cat gac gaa gaa aca aag aca tca gag 1632
Gly Tyr Ile Phe Cys His Val His Asp Glu Glu Thr Lys Thr Ser Glu

530

535

540

ctt cag att att aac gct gtt aat tta aag ctt gaa gct acg att aaa 1680
Leu Gln Ile Ile Asn Ala Val Asn Leu Lys Leu Glu Ala Thr Ile Lys

545

550

555

560

cta ccg tct aga gta ccg tat ggg ttt cat ggc aca ttt gtg gat tcg 1728
Leu Pro Ser Arg Val Pro Tyr Gly Phe His Gly Thr Phe Val Asp Ser

565

570

575

aat gaa ctc gtt gat caa tta taa 1752
Asn Glu Leu Val Asp Gln Leu

580

<210> 2

<211> 583

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Val Ser Leu Leu Thr Met Pro Met Ser Gly Gly Ile Lys Thr Trp

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Pro Gln Ala Gln Ile Asp Leu Gly Phe Arg Pro Ile Lys Arg Gln Pro | | | |
| 20 | 25 | 30 | |
| Lys Val Ile Lys Cys Thr Val Gln Ile Asp Val Thr Glu Leu Thr Lys | | | |
| 35 | 40 | 45 | |
| Lys Arg Gln Leu Phe Thr Pro Arg Thr Thr Ala Thr Pro Pro Gln His | | | |
| 50 | 55 | 60 | |
| Asn Pro Leu Arg Leu Asn Ile Phe Gln Lys Ala Ala Ala Ile Ala Ile | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Asp Ala Ala Glu Arg Ala Leu Ile Ser His Glu Gln Asp Ser Pro Leu | | | |
| 85 | 90 | 95 | |
| Pro Lys Thr Ala Asp Pro Arg Val Gln Ile Ala Gly Asn Tyr Ser Pro | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| Val Pro Glu Ser Ser Val Arg Arg Asn Leu Thr Val Glu Gly Thr Ile | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| Pro Asp Cys Ile Asp Gly Val Tyr Ile Arg Asn Gly Ala Asn Pro Met | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Phe Glu Pro Thr Ala Gly His His Leu Phe Asp Gly Asp Gly Met Val | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |

His Ala Val Lys Ile Thr Asn Gly Ser Ala Ser Tyr Ala Cys Arg Phe
165 170 175

Thr Lys Thr Glu Arg Leu Val Gln Glu Lys Arg Leu Gly Arg Pro Val
180 185 190

Phe Pro Lys Ala Ile Gly Glu Leu His Gly His Ser Gly Ile Ala Arg
195 200 205

Leu Met Leu Phe Tyr Ala Arg Gly Leu Cys Gly Leu Ile Asn Asn Gln
210 215 220

Asn Gly Val Gly Val Ala Asn Ala Gly Leu Val Tyr Phe Asn Asn Arg
225 230 235 240

Leu Leu Ala Met Ser Glu Asp Asp Leu Pro Tyr Gln Leu Lys Ile Thr
245 250 255

Gln Thr Gly Asp Leu Gln Thr Val Gly Arg Tyr Asp Phe Asp Gly Gln
260 265 270

Leu Lys Ser Ala Met Ile Ala His Pro Lys Leu Asp Pro Val Thr Lys
275 280 285

Glu Leu His Ala Leu Ser Tyr Asp Val Val Lys Lys Pro Tyr Leu Lys
290 295 300

Tyr Phe Arg Phe Ser Pro Asp Gly Val Lys Ser Pro Glu Leu Glu Ile
305 310 315 320

Pro Leu Glu Thr Pro Thr Met Ile His Asp Phe Ala Ile Thr Glu Asn
325 330 335

Phe Val Val Ile Pro Asp Gln Gln Val Val Phe Lys Leu Gly Glu Met
340 345 350

Ile Ser Gly Lys Ser Pro Val Val Phe Asp Gly Glu Lys Val Ser Arg
355 360 365

Leu Gly Ile Met Pro Lys Asp Ala Thr Glu Ala Ser Gln Ile Ile Trp
370 375 380

Val Asn Ser Pro Glu Thr Phe Cys Phe His Leu Trp Asn Ala Trp Glu
385 390 395 400

Ser Pro Glu Thr Glu Glu Ile Val Val Ile Gly Ser Cys Met Ser Pro
405 410 415

Ala Asp Ser Ile Phe Asn Glu Arg Asp Glu Ser Leu Arg Ser Val Leu
420 425 430

Ser Glu Ile Arg Ile Asn Leu Arg Thr Arg Lys Thr Thr Arg Arg Ser
435 440 445

Leu Leu Val Asn Glu Asp Val Asn Leu Glu Ile Gly Met Val Asn Arg
450 455 460

Asn Arg Leu Gly Arg Lys Thr Arg Phe Ala Phe Leu Ala Ile Ala Tyr

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 465 | 470 | 475 | 480 |
| Pro Trp Pro Lys Val Ser Gly Phe Ala Lys Val Asp Leu Cys Thr Gly | | | |
| | 485 | 490 | 495 |
| Glu Met Lys Lys Tyr Ile Tyr Gly Gly Glu Lys Tyr Gly Gly Glu Pro | | | |
| | 500 | 505 | 510 |
| Phe Phe Leu Pro Gly Asn Ser Gly Asn Gly Glu Glu Asn Glu Asp Asp | | | |
| | 515 | 520 | 525 |
| Gly Tyr Ile Phe Cys His Val His Asp Glu Glu Thr Lys Thr Ser Glu | | | |
| | 530 | 535 | 540 |
| Leu Gln Ile Ile Asn Ala Val Asn Leu Lys Leu Glu Ala Thr Ile Lys | | | |
| 545 | 550 | 555 | 560 |
| Leu Pro Ser Arg Val Pro Tyr Gly Phe His Gly Thr Phe Val Asp Ser | | | |
| | 565 | 570 | 575 |
| Asn Glu Leu Val Asp Gln Leu | | | |
| | 580 | | |

<210> 3

<211> 1788

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1788)

<400> 3

atg gac tct gtt tct tct tct tcc ttc ctc tcc tcc aca ttc tct ctt 48

Met Asp Ser Val Ser Ser Ser Ser Phe Leu Ser Ser Thr Phe Ser Leu

1 5 10 15

cat cac tct ctt ctt cgc cgc cga tct tcc tct cct act ctc ctc cgt 96

His His Ser Leu Leu Arg Arg Arg Ser Ser Ser Pro Thr Leu Leu Arg

20 25 30

atc aac tcc gcc gtc gtc gaa gaa cgt tct cca atc aca aac cca agc 144

Ile Asn Ser Ala Val Val Glu Glu Arg Ser Pro Ile Thr Asn Pro Ser

35 40 45

gac aac aat gat cgt cgt aac aaa ccc aaa aca ctc cac aac cga acc 192

Asp Asn Asn Asp Arg Arg Asn Lys Pro Lys Thr Leu His Asn Arg Thr

50 55 60

aat cac acc tta gtc tca tca cca ccg aaa ctc cga cca gaa atg act 240

Asn His Thr Leu Val Ser Ser Pro Pro Lys Leu Arg Pro Glu Met Thr

65 70 75 80

ctc gca aca gct ctc ttc acc acc gtc gaa gat gta atc aac acg ttc 288

Leu Ala Thr Ala Leu Phe Thr Thr Val Glu Asp Val Ile Asn Thr Phe

85 90 95

atc gat cca cct tca cgt cct tcc gtt gat cca aaa cat gtc ctc tct 336
Ile Asp Pro Pro Ser Arg Pro Ser Val Asp Pro Lys His Val Leu Ser

100

105

110

gat aac ttc gct cct gtc ctc gac gag ctt cct cca aca gac tgt gaa 384
Asp Asn Phe Ala Pro Val Leu Asp Glu Leu Pro Pro Thr Asp Cys Glu

115

120

125

atc atc cac ggc act ctt cca ctg tca ctt aac ggc gct tac atc cgt 432
Ile Ile His Gly Thr Leu Pro Leu Ser Leu Asn Gly Ala Tyr Ile Arg

130

135

140

aac ggt cca aat cca cag ttt ctc cct cgt ggt cct tac cat ctc ttc 480
Asn Gly Pro Asn Pro Gln Phe Leu Pro Arg Gly Pro Tyr His Leu Phe

145

150

155

160

gac ggc gac ggt atg ctt cac gcc ata aaa atc cac aac ggt aaa gcc 528
Asp Gly Asp Gly Met Leu His Ala Ile Lys Ile His Asn Gly Lys Ala

165

170

175

act ctc tgt agc aga tac gtc aag act tat aaa tac aac gtc gag aaa 576
Thr Leu Cys Ser Arg Tyr Val Lys Thr Tyr Lys Tyr Asn Val Glu Lys

180

185

190

caa acc gga gct ccg gtt atg cct aac gtg ttt tcc gga ttc aac ggt 624
Gln Thr Gly Ala Pro Val Met Pro Asn Val Phe Ser Gly Phe Asn Gly

195

200

205

gta acg gcg tca gta gct cgt gga gct tta acg gca gct agg gtt tta 672

Val Thr Ala Ser Val Ala Arg Gly Ala Leu Thr Ala Ala Arg Val Leu

210

215

220

acc gga cag tat aat ccg gtt aac ggc att ggt tta gct aat aca agt 720

Thr Gly Gln Tyr Asn Pro Val Asn Gly Ile Gly Leu Ala Asn Thr Ser

225

230

235

240

cta gct ttc ttc agt aac cgt ctc ttt gct tta ggt gaa tct gat tta 768

Leu Ala Phe Phe Ser Asn Arg Leu Phe Ala Leu Gly Glu Ser Asp Leu

245

250

255

ccc tac gcc gtc cga tta acc gaa tca gga gat att gaa acg atc gga 816

Pro Tyr Ala Val Arg Leu Thr Glu Ser Gly Asp Ile Glu Thr Ile Gly

260

265

270

cgg tac gat ttc gac ggg aaa tta gcg atg agt atg aca gct cat cct 864

Arg Tyr Asp Phe Asp Gly Lys Leu Ala Met Ser Met Thr Ala His Pro

275

280

285

aaa acc gat cca ata acc gga gaa act ttc gct ttc cgg tac ggt ccg 912

Lys Thr Asp Pro Ile Thr Gly Glu Thr Phe Ala Phe Arg Tyr Gly Pro

290

295

300

gtt cca ccg ttt tta aca tat ttc cgg ttt gat tcc gcc ggg aaa aaa 960

Val Pro Pro Phe Leu Thr Tyr Phe Arg Phe Asp Ser Ala Gly Lys Lys

305

310

315

320

caa aga gac gtt ccg ata ttc tcg atg acg tct ccg tcg ttt ctc cat 1008

Gln Arg Asp Val Pro Ile Phe Ser Met Thr Ser Pro Ser Phe Leu His

| | | | |
|--|-----|-----|-----|
| 325 | 330 | 335 | |
| gac ttc gcg atc acg aaa cgt cac gcg att ttc gca gag att cag ctt 1056 | | | |
| Asp Phe Ala Ile Thr Lys Arg His Ala Ile Phe Ala Glu Ile Gln Leu | | | |
| 340 | 345 | 350 | |
| ggc atg agg atg aac atg ttg gat ttg gtt ctc gaa ggt ggt tct ccg 1104 | | | |
| Gly Met Arg Met Asn Met Leu Asp Leu Val Leu Glu Gly Gly Ser Pro | | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| gtt ggt act gat aac gga aaa act cca agg ctt gga gtg att cct aag 1152 | | | |
| Val Gly Thr Asp Asn Gly Lys Thr Pro Arg Leu Gly Val Ile Pro Lys | | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| tac gcc gga gat gag tcg gag atg aaa tgg ttc gaa gtt cct gga ttc 1200 | | | |
| Tyr Ala Gly Asp Glu Ser Glu Met Lys Trp Phe Glu Val Pro Gly Phe | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| aat atc att cac gct att aat gct tgg gat gaa gat gat gga aac agc 1248 | | | |
| Asn Ile Ile His Ala Ile Asn Ala Trp Asp Glu Asp Asp Gly Asn Ser | | | |
| 405 | 410 | 415 | |
| gtc gtt ttg att gca ccg aat att atg tcg att gaa cat act tta gag 1296 | | | |
| Val Val Leu Ile Ala Pro Asn Ile Met Ser Ile Glu His Thr Leu Glu | | | |
| 420 | 425 | 430 | |
| agg atg gat ctg gtt cat gct ttg gtg gag aag gtg aag atc gat ctc 1344 | | | |
| Arg Met Asp Leu Val His Ala Leu Val Glu Lys Val Lys Ile Asp Leu | | | |
| 435 | 440 | 445 | |

gtc acc ggg att gtg aga cgt cat ccg atc tca gcg agg aat ctc gat 1392
Val Thr Gly Ile Val Arg Arg His Pro Ile Ser Ala Arg Asn Leu Asp

450

455

460

ttc gct gtg att aat ccg gcg ttt ctc ggg aga tgt agc agg tac gtt 1440
Phe Ala Val Ile Asn Pro Ala Phe Leu Gly Arg Cys Ser Arg Tyr Val

465

470

475

480

tac gcg gcg att gga gat ccg atg ccg aag atc tcc ggt gtg gtg aag 1488
Tyr Ala Ala Ile Gly Asp Pro Met Pro Lys Ile Ser Gly Val Val Lys

485

490

495

ctt gat gtg tct aaa gga gat cgg gat gat tgt acg gtg gcc cgt aga 1536
Leu Asp Val Ser Lys Gly Asp Arg Asp Asp Cys Thr Val Ala Arg Arg

500

505

510

atg tac ggt tca ggt tgt tac ggc gga gaa ccg ttt ttc gta gct agg 1584
Met Tyr Gly Ser Gly Cys Tyr Gly Gly Glu Pro Phe Phe Val Ala Arg

515

520

525

gat cct ggt aat ccg gag gcg gag gag gat gat ggt tat gtg gtg acg 1632
Asp Pro Gly Asn Pro Glu Ala Glu Glu Asp Asp Gly Tyr Val Val Thr

530

535

540

tat gtt cac gat gaa gtg act gga gaa tcg aag ttt ctg gtg atg gac 1680
Tyr Val His Asp Glu Val Thr Gly Glu Ser Lys Phe Leu Val Met Asp

545

550

555

560

gct aaa tcg ccg gag ctt gaa atc gtc gcc gcc gtg agg ttg ccg cga 1728

Ala Lys Ser Pro Glu Leu Glu Ile Val Ala Ala Val Arg Leu Pro Arg

565

570

575

agg gtt ccg tac gga ttc cat ggg tta ttt gtc aag gaa agt gac ctt 1776

Arg Val Pro Tyr Gly Phe His Gly Leu Phe Val Lys Glu Ser Asp Leu

580

585

590

aat aag ctt taa

1788

Asn Lys Leu

595

<210> 4

<211> 595

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 4

Met Asp Ser Val Ser Ser Ser Ser Phe Leu Ser Ser Thr Phe Ser Leu

1

5

10

15

His His Ser Leu Leu Arg Arg Arg Ser Ser Ser Pro Thr Leu Leu Arg

20

25

30

Ile Asn Ser Ala Val Val Glu Glu Arg Ser Pro Ile Thr Asn Pro Ser

35

40

45

Asp Asn Asn Asp Arg Arg Asn Lys Pro Lys Thr Leu His Asn Arg Thr

| | | |
|---|-----|-----|
| 50 | 55 | 60 |
| Asn His Thr Leu Val Ser Ser Pro Pro Lys Leu Arg Pro Glu Met Thr | | |
| 65 | 70 | 75 |
| 80 | | |
| Leu Ala Thr Ala Leu Phe Thr Thr Val Glu Asp Val Ile Asn Thr Phe | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Ile Asp Pro Pro Ser Arg Pro Ser Val Asp Pro Lys His Val Leu Ser | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Asp Asn Phe Ala Pro Val Leu Asp Glu Leu Pro Pro Thr Asp Cys Glu | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Ile Ile His Gly Thr Leu Pro Leu Ser Leu Asn Gly Ala Tyr Ile Arg | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Asn Gly Pro Asn Pro Gln Phe Leu Pro Arg Gly Pro Tyr His Leu Phe | | |
| 145 | 150 | 155 |
| 160 | | |
| Asp Gly Asp Gly Met Leu His Ala Ile Lys Ile His Asn Gly Lys Ala | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Thr Leu Cys Ser Arg Tyr Val Lys Thr Tyr Lys Tyr Asn Val Glu Lys | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Gln Thr Gly Ala Pro Val Met Pro Asn Val Phe Ser Gly Phe Asn Gly | | |
| 195 | 200 | 205 |

Val Thr Ala Ser Val Ala Arg Gly Ala Leu Thr Ala Ala Arg Val Leu
210 215 220

Thr Gly Gln Tyr Asn Pro Val Asn Gly Ile Gly Leu Ala Asn Thr Ser
225 230 235 240

Leu Ala Phe Phe Ser Asn Arg Leu Phe Ala Leu Gly Glu Ser Asp Leu
245 250 255

Pro Tyr Ala Val Arg Leu Thr Glu Ser Gly Asp Ile Glu Thr Ile Gly
260 265 270

Arg Tyr Asp Phe Asp Gly Lys Leu Ala Met Ser Met Thr Ala His Pro
275 280 285

Lys Thr Asp Pro Ile Thr Gly Glu Thr Phe Ala Phe Arg Tyr Gly Pro
290 295 300

Val Pro Pro Phe Leu Thr Tyr Phe Arg Phe Asp Ser Ala Gly Lys Lys
305 310 315 320

Gln Arg Asp Val Pro Ile Phe Ser Met Thr Ser Pro Ser Phe Leu His
325 330 335

Asp Phe Ala Ile Thr Lys Arg His Ala Ile Phe Ala Glu Ile Gln Leu
340 345 350

Gly Met Arg Met Asn Met Leu Asp Leu Val Leu Glu Gly Gly Ser Pro
355 360 365

Val Gly Thr Asp Asn Gly Lys Thr Pro Arg Leu Gly Val Ile Pro Lys
370 375 380

Tyr Ala Gly Asp Glu Ser Glu Met Lys Trp Phe Glu Val Pro Gly Phe
385 390 395 400

Asn Ile Ile His Ala Ile Asn Ala Trp Asp Glu Asp Asp Gly Asn Ser
405 410 415

Val Val Leu Ile Ala Pro Asn Ile Met Ser Ile Glu His Thr Leu Glu
420 425 430

Arg Met Asp Leu Val His Ala Leu Val Glu Lys Val Lys Ile Asp Leu
435 440 445

Val Thr Gly Ile Val Arg Arg His Pro Ile Ser Ala Arg Asn Leu Asp
450 455 460

Phe Ala Val Ile Asn Pro Ala Phe Leu Gly Arg Cys Ser Arg Tyr Val
465 470 475 480

Tyr Ala Ala Ile Gly Asp Pro Met Pro Lys Ile Ser Gly Val Val Lys
485 490 495

Leu Asp Val Ser Lys Gly Asp Arg Asp Asp Cys Thr Val Ala Arg Arg
500 505 510

Met Tyr Gly Ser Gly Cys Tyr Gly Gly Glu Pro Phe Phe Val Ala Arg

515

520

525

Asp Pro Gly Asn Pro Glu Ala Glu Glu Asp Asp Gly Tyr Val Val Thr

530

535

540

Tyr Val His Asp Glu Val Thr Gly Glu Ser Lys Phe Leu Val Met Asp

545

550

555

560

Ala Lys Ser Pro Glu Leu Glu Ile Val Ala Ala Val Arg Leu Pro Arg

565

570

575

Arg Val Pro Tyr Gly Phe His Gly Leu Phe Val Lys Glu Ser Asp Leu

580

585

590

Asn Lys Leu

595

<210> 5

<211> 1800

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1800)

<400> 5

atg gct tct ttc acg gca acg gct gcg gtt tct ggg aga tgg ctt ggt 48

Met Ala Ser Phe Thr Ala Thr Ala Ala Val Ser Gly Arg Trp Leu Gly
 1 5 10 15

ggc aat cat act cag ccg cca tta tcg tct tct caa agc tcc gac ttg 96
 Gly Asn His Thr Gln Pro Pro Leu Ser Ser Ser Gln Ser Ser Asp Leu
 20 25 30

agt tat tgt agc tcc tta cct atg gcc agt cgt gtc aca cgt aag ctc 144
 Ser Tyr Cys Ser Ser Leu Pro Met Ala Ser Arg Val Thr Arg Lys Leu
 35 40 45

aat gtt tca tct gcg ctt cac act cct cca gct ctt cat ttc cct aag 192
 Asn Val Ser Ser Ala Leu His Thr Pro Pro Ala Leu His Phe Pro Lys
 50 55 60

caa tca tca aac tct ccc gcc att gtt gtt aag ccc aaa gcc aaa gaa 240
 Gln Ser Ser Asn Ser Pro Ala Ile Val Val Lys Pro Lys Ala Lys Glu
 65 70 75 80

tcc aac act aaa cag atg aat ttg ttc cag aga gcg gcg gcg gca gcg 288
 Ser Asn Thr Lys Gln Met Asn Leu Phe Gln Arg Ala Ala Ala Ala Ala
 85 90 95

ttg gac gcg gcg gag ggt ttc ctt gtc agc cac gag aag cta cac ccg 336
 Leu Asp Ala Ala Glu Gly Phe Leu Val Ser His Glu Lys Leu His Pro
 100 105 110

ctt cct aaa acg gct gat cct agt gtt cag atc gcc gga aat ttt gct 384
 Leu Pro Lys Thr Ala Asp Pro Ser Val Gln Ile Ala Gly Asn Phe Ala

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 115 | 120 | 125 | |
| ccg gtg aat gaa cag ccc gtc cgg cgt aat ctt ccg gtg gtc gga aaa | 432 | | |
| Pro Val Asn Glu Gln Pro Val Arg Arg Asn Leu Pro Val Val Gly Lys | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| ctt ccc gat tcc atc aaa gga gtg tat gtg cgc aac gga gct aac cca | 480 | | |
| Leu Pro Asp Ser Ile Lys Gly Val Tyr Val Arg Asn Gly Ala Asn Pro | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| ctt cac gag ccg gtg aca ggt cac cac ttc ttc gac gga gac ggt atg | 528 | | |
| Leu His Glu Pro Val Thr Gly His His Phe Phe Asp Gly Asp Gly Met | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| gtt cac gcc gtc aaa ttc gaa cac ggt tca gct agc tac gct tgc cgg | 576 | | |
| Val His Ala Val Lys Phe Glu His Gly Ser Ala Ser Tyr Ala Cys Arg | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| ttt act cag act aac cgg ttt gtt cag gaa cgt caa ttg ggt cga ccg | 624 | | |
| Phe Thr Gln Thr Asn Arg Phe Val Gln Glu Arg Gln Leu Gly Arg Pro | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| gtt ttc ccc aaa gcc atc ggt gag ctt cac ggc cac acc ggt att gcc | 672 | | |
| Val Phe Pro Lys Ala Ile Gly Glu Leu His Gly His Thr Gly Ile Ala | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| cga ctc atg cta ttc tac gcc aga gct gca gcc ggt ata gtc gac ccg | 720 | | |
| Arg Leu Met Leu Phe Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Gly Ile Val Asp Pro | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |

gca cac gga acc ggt gta gct aac gcc ggt ttg gtc tat ttc aat ggc 768

Ala His Gly Thr Gly Val Ala Asn Ala Gly Leu Val Tyr Phe Asn Gly

245

250

255

cgg tta ttg gct atg tcg gag gat gat tta cct tac caa gtt cag atc 816

Arg Leu Leu Ala Met Ser Glu Asp Asp Leu Pro Tyr Gln Val Gln Ile

260

265

270

act ccc aat gga gat tta aaa acc gtt ggt cgg ttc gat ttt gat gga 864

Thr Pro Asn Gly Asp Leu Lys Thr Val Gly Arg Phe Asp Phe Asp Gly

275

280

285

caa tta gaa tcc aca atg att gcc cac ccg aaa gtc gac ccg gaa tcc 912

Gln Leu Glu Ser Thr Met Ile Ala His Pro Lys Val Asp Pro Glu Ser

290

295

300

ggt gaa ctc ttc gct tta agc tac gac gtc gtt tca aag cct tac cta 960

Gly Glu Leu Phe Ala Leu Ser Tyr Asp Val Val Ser Lys Pro Tyr Leu

305

310

315

320

aaa tac ttc cga ttc tca ccg gac gga act aaa tca ccg gac gtc gag 1008

Lys Tyr Phe Arg Phe Ser Pro Asp Gly Thr Lys Ser Pro Asp Val Glu

325

330

335

att cag ctt gat cag cca acg atg atg cac gat ttc gcg att aca gag 1056

Ile Gln Leu Asp Gln Pro Thr Met Met His Asp Phe Ala Ile Thr Glu

340

345

350

aac ttc gtc gtc gta cct gac cag caa gtc gtt ttc aag ctg ccg gag 1104
Asn Phe Val Val Val Pro Asp Gln Gln Val Val Phe Lys Leu Pro Glu

355

360

365

atg atc cgc ggt ggg tct ccg gtg gtt tac gac aag aac aag gtc gca 1152
Met Ile Arg Gly Gly Ser Pro Val Val Tyr Asp Lys Asn Lys Val Ala

370

375

380

aga ttc ggg att tta gac aaa tac gcc gaa gat tca tcg aac att aag 1200
Arg Phe Gly Ile Leu Asp Lys Tyr Ala Glu Asp Ser Ser Asn Ile Lys

385

390

395

400

tgg att gat gct cca gat tgc ttc tgc ttc cat ctc tgg aac gct tgg 1248
Trp Ile Asp Ala Pro Asp Cys Phe Cys Phe His Leu Trp Asn Ala Trp

405

410

415

gaa gag cca gaa aca gat gaa gtc gtc gtg ata ggg tcc tgt atg act 1296
Glu Glu Pro Glu Thr Asp Glu Val Val Val Ile Gly Ser Cys Met Thr

420

425

430

cca cca gac tca att ttc aac gag tct gac gag aat ctc aag agt gtc 1344
Pro Pro Asp Ser Ile Phe Asn Glu Ser Asp Glu Asn Leu Lys Ser Val

435

440

445

ctg tct gaa atc cgc ctg aat ctc aaa acc ggt gaa tca act cgc cgt 1392
Leu Ser Glu Ile Arg Leu Asn Leu Lys Thr Gly Glu Ser Thr Arg Arg

450

455

460

ccg atc atc tcc aac gaa gat caa caa gtc aac ctc gaa gca ggg atg 1440

Pro Ile Ile Ser Asn Glu Asp Gln Gln Val Asn Leu Glu Ala Gly Met

465 470 475 480

gtc aac aga aac atg ctc ggc cgt aaa acc aaa ttc gct tac ttg gct 1488

Val Asn Arg Asn Met Leu Gly Arg Lys Thr Lys Phe Ala Tyr Leu Ala

485 490 495

tta gcc gag ccg tgg cct aaa gtc tca gga ttc gct aaa gtt gat ctc 1536

Leu Ala Glu Pro Trp Pro Lys Val Ser Gly Phe Ala Lys Val Asp Leu

500 505 510

act act gga gaa gtt aag aaa cat ctt tac ggc gat aac cgt tac gga 1584

Thr Thr Gly Glu Val Lys Lys His Leu Tyr Gly Asp Asn Arg Tyr Gly

515 520 525

gga gag cct ctg ttt ctc ccc gga gaa gga gga gag gaa gac gaa gga 1632

Gly Glu Pro Leu Phe Leu Pro Gly Glu Gly Gly Glu Glu Asp Glu Gly

530 535 540

tac atc ctc tgt ttc gtt cac gac gag aag aca tgg aaa tcg gag tta 1680

Tyr Ile Leu Cys Phe Val His Asp Glu Lys Thr Trp Lys Ser Glu Leu

545 550 555 560

cag ata gtt aac gcc gtt agc tta gag gtt gaa gca acg gtt aaa ctt 1728

Gln Ile Val Asn Ala Val Ser Leu Glu Val Glu Ala Thr Val Lys Leu

565 570 575

ccg tca agg gtt ccg tac gga ttt cac ggt aca ttc atc gga gcc gat 1776

Pro Ser Arg Val Pro Tyr Gly Phe His Gly Thr Phe Ile Gly Ala Asp

580

585

590

gat ttg gcg aag cag gtc gtg tga

1800

Asp Leu Ala Lys Gln Val Val

595

600

<210> 6

<211> 599

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

Met Ala Ser Phe Thr Ala Thr Ala Ala Val Ser Gly Arg Trp Leu Gly

1

5

10

15

Gly Asn His Thr Gln Pro Pro Leu Ser Ser Ser Gln Ser Ser Asp Leu

20

25

30

Ser Tyr Cys Ser Ser Leu Pro Met Ala Ser Arg Val Thr Arg Lys Leu

35

40

45

Asn Val Ser Ser Ala Leu His Thr Pro Pro Ala Leu His Phe Pro Lys

50

55

60

Gln Ser Ser Asn Ser Pro Ala Ile Val Val Lys Pro Lys Ala Lys Glu

65

70

75

80

Ser Asn Thr Lys Gln Met Asn Leu Phe Gln Arg Ala Ala Ala Ala Ala

85

90

95

Leu Asp Ala Ala Glu Gly Phe Leu Val Ser His Glu Lys Leu His Pro

100

105

110

Leu Pro Lys Thr Ala Asp Pro Ser Val Gln Ile Ala Gly Asn Phe Ala

115

120

125

Pro Val Asn Glu Gln Pro Val Arg Arg Asn Leu Pro Val Val Gly Lys

130

135

140

Leu Pro Asp Ser Ile Lys Gly Val Tyr Val Arg Asn Gly Ala Asn Pro

145

150

155

160

Leu His Glu Pro Val Thr Gly His His Phe Phe Asp Gly Asp Gly Met

165

170

175

Val His Ala Val Lys Phe Glu His Gly Ser Ala Ser Tyr Ala Cys Arg

180

185

190

Phe Thr Gln Thr Asn Arg Phe Val Gln Glu Arg Gln Leu Gly Arg Pro

195

200

205

Val Phe Pro Lys Ala Ile Gly Glu Leu His Gly His Thr Gly Ile Ala

210

215

220

Arg Leu Met Leu Phe Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Gly Ile Val Asp Pro

225

230

235

240

Ala His Gly Thr Gly Val Ala Asn Ala Gly Leu Val Tyr Phe Asn Gly
245 250 255

Arg Leu Leu Ala Met Ser Glu Asp Asp Leu Pro Tyr Gln Val Gln Ile
260 265 270

Thr Pro Asn Gly Asp Leu Lys Thr Val Gly Arg Phe Asp Phe Asp Gly
275 280 285

Gln Leu Glu Ser Thr Met Ile Ala His Pro Lys Val Asp Pro Glu Ser
290 295 300

Gly Glu Leu Phe Ala Leu Ser Tyr Asp Val Val Ser Lys Pro Tyr Leu
305 310 315 320

Lys Tyr Phe Arg Phe Ser Pro Asp Gly Thr Lys Ser Pro Asp Val Glu
325 330 335

Ile Gln Leu Asp Gln Pro Thr Met Met His Asp Phe Ala Ile Thr Glu
340 345 350

Asn Phe Val Val Val Pro Asp Gln Gln Val Val Phe Lys Leu Pro Glu
355 360 365

Met Ile Arg Gly Gly Ser Pro Val Val Tyr Asp Lys Asn Lys Val Ala
370 375 380

Arg Phe Gly Ile Leu Asp Lys Tyr Ala Glu Asp Ser Ser Asn Ile Lys
385 390 395 400

Trp Ile Asp Ala Pro Asp Cys Phe Cys Phe His Leu Trp Asn Ala Trp
 405 410 415

Glu Glu Pro Glu Thr Asp Glu Val Val Val Ile Gly Ser Cys Met Thr
 420 425 430

Pro Pro Asp Ser Ile Phe Asn Glu Ser Asp Glu Asn Leu Lys Ser Val
 435 440 445

Leu Ser Glu Ile Arg Leu Asn Leu Lys Thr Gly Glu Ser Thr Arg Arg
 450 455 460

Pro Ile Ile Ser Asn Glu Asp Gln Gln Val Asn Leu Glu Ala Gly Met
 465 470 475 480

Val Asn Arg Asn Met Leu Gly Arg Lys Thr Lys Phe Ala Tyr Leu Ala
 485 490 495

Leu Ala Glu Pro Trp Pro Lys Val Ser Gly Phe Ala Lys Val Asp Leu
 500 505 510

Thr Thr Gly Glu Val Lys Lys His Leu Tyr Gly Asp Asn Arg Tyr Gly
 515 520 525

Gly Glu Pro Leu Phe Leu Pro Gly Glu Gly Gly Glu Glu Asp Glu Gly
 530 535 540

Tyr Ile Leu Cys Phe Val His Asp Glu Lys Thr Trp Lys Ser Glu Leu

545 550 555 560

Gln Ile Val Asn Ala Val Ser Leu Glu Val Glu Ala Thr Val Lys Leu

565 570 575

Pro Ser Arg Val Pro Tyr Gly Phe His Gly Thr Phe Ile Gly Ala Asp

580 585 590

Asp Leu Ala Lys Gln Val Val

595

<210> 7

<211> 1617

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1617)

<400> 7

atg gcg gag aaa ctc agt gat ggc agc agc atc atc tca gtc cat cct 48

Met Ala Glu Lys Leu Ser Asp Gly Ser Ser Ile Ile Ser Val His Pro

1 5 10 15

aga ccc tcc aag ggt ttc tcc tcg aag ctt ctc gat ctt ctc gag aga 96

Arg Pro Ser Lys Gly Phe Ser Ser Lys Leu Leu Asp Leu Leu Glu Arg

20 25 30

ctt gtt gtc aag ctc atg cac gat gct tct ctc cct ctc cac tac ctc 144
Leu Val Val Lys Leu Met His Asp Ala Ser Leu Pro Leu His Tyr Leu

35

40

45

tca ggc aac ttc gct ccc atc cgt gat gaa act cct ccc gtc aag gat 192
Ser Gly Asn Phe Ala Pro Ile Arg Asp Glu Thr Pro Pro Val Lys Asp

50

55

60

ctc ccc gtc cat gga ttt ctt ccc gaa tgc ttg aat ggt gaa ttt gtg 240
Leu Pro Val His Gly Phe Leu Pro Glu Cys Leu Asn Gly Glu Phe Val

65

70

75

80

agg gtt ggt cca aac ccc aag ttt gat gct gtc gct gga tat cac tgg 288
Arg Val Gly Pro Asn Pro Lys Phe Asp Ala Val Ala Gly Tyr His Trp

85

90

95

ttt gat gga gat ggg atg att cat ggg gta cgc atc aaa gat ggg aaa 336
Phe Asp Gly Asp Gly Met Ile His Gly Val Arg Ile Lys Asp Gly Lys

100

105

110

gct act tat gtt tct cga tat gtt aag aca tca cgt ctt aag cag gaa 384
Ala Thr Tyr Val Ser Arg Tyr Val Lys Thr Ser Arg Leu Lys Gln Glu

115

120

125

gag ttc ttc gga gct gcc aaa ttc atg aag att ggt gac ctt aag ggg 432
Glu Phe Phe Gly Ala Ala Lys Phe Met Lys Ile Gly Asp Leu Lys Gly

130

135

140

ttt ttc gga ttg cta atg gtc aat gtc caa cag ctg aga acg aag ctc 480
Phe Phe Gly Leu Leu Met Val Asn Val Gln Gln Leu Arg Thr Lys Leu
145 150 155 160

aaa ata ttg gac aac act tat gga aat gga act gcc aat aca gca ctc 528
Lys Ile Leu Asp Asn Thr Tyr Gly Asn Gly Thr Ala Asn Thr Ala Leu
165 170 175

gta tat cac cat gga aaa ctt cta gca tta cag gag gca gat aag ccg 576
Val Tyr His His Gly Lys Leu Leu Ala Leu Gln Glu Ala Asp Lys Pro
180 185 190

tac gtc atc aaa gtt ttg gaa gat gga gac ctg caa act ctt ggt ata 624
Tyr Val Ile Lys Val Leu Glu Asp Gly Asp Leu Gln Thr Leu Gly Ile
195 200 205

ata gat tat gac aag aga ttg acc cac tcc ttc act gct cac cca aaa 672
Ile Asp Tyr Asp Lys Arg Leu Thr His Ser Phe Thr Ala His Pro Lys
210 215 220

gtt gac ccg gtt acg ggt gaa atg ttt aca ttc ggc tat tcg cat acg 720
Val Asp Pro Val Thr Gly Glu Met Phe Thr Phe Gly Tyr Ser His Thr
225 230 235 240

cca cct tat ctc aca tac aga gtt atc tcg aaa gat ggc att atg cat 768
Pro Pro Tyr Leu Thr Tyr Arg Val Ile Ser Lys Asp Gly Ile Met His
245 250 255

gac cca gtc cca att act ata tca gag cct atc atg atg cat gat ttt 816

Asp Pro Val Pro Ile Thr Ile Ser Glu Pro Ile Met Met His Asp Phe

260

265

270

gct att act gag act tat gca atc ttc atg gat ctt cct atg cac ttc 864

Ala Ile Thr Glu Thr Tyr Ala Ile Phe Met Asp Leu Pro Met His Phe

275

280

285

agg cca aag gaa atg gtg aaa gag aag aaa atg ata tac tca ttt gat 912

Arg Pro Lys Glu Met Val Lys Glu Lys Lys Met Ile Tyr Ser Phe Asp

290

295

300

ccc aca aaa aag gct cgt ttt ggt gtt ctt cca cgc tat gcc aag gat 960

Pro Thr Lys Lys Ala Arg Phe Gly Val Leu Pro Arg Tyr Ala Lys Asp

305

310

315

320

gaa ctt atg att aga tgg ttt gag ctt ccc aac tgc ttt att ttc cac 1008

Glu Leu Met Ile Arg Trp Phe Glu Leu Pro Asn Cys Phe Ile Phe His

325

330

335

aac gcc aat gct tgg gaa gaa gag gat gaa gtc gtc ctc atc act tgt 1056

Asn Ala Asn Ala Trp Glu Glu Glu Asp Glu Val Val Leu Ile Thr Cys

340

345

350

cgt ctt gag aat cca gat ctt gac atg gtc agt ggg aaa gtg aaa gaa 1104

Arg Leu Glu Asn Pro Asp Leu Asp Met Val Ser Gly Lys Val Lys Glu

355

360

365

aaa ctc gaa aat ttt ggc aac gaa ctg tac gaa atg aga ttc aac atg 1152

Lys Leu Glu Asn Phe Gly Asn Glu Leu Tyr Glu Met Arg Phe Asn Met

| | | | |
|--|-----|-----|-----|
| 370 | 375 | 380 | |
| aaa acg ggc tca gct tct caa aaa aaa cta tcc gca tct gcg gtt gat 1200 | | | |
| Lys Thr Gly Ser Ala Ser Gln Lys Lys Leu Ser Ala Ser Ala Val Asp | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| ttc ccc aga atc aat gag tgc tac acc gga aag aaa cag aga tac gta 1248 | | | |
| Phe Pro Arg Ile Asn Glu Cys Tyr Thr Gly Lys Lys Gln Arg Tyr Val | | | |
| | 405 | 410 | 415 |
| tat gga aca att ctg gac agt atc gca aag gtt acc gga atc atc aag 1296 | | | |
| Tyr Gly Thr Ile Leu Asp Ser Ile Ala Lys Val Thr Gly Ile Ile Lys | | | |
| | 420 | 425 | 430 |
| ttt gat ctg cat gca gaa gct gag aca ggg aaa aga atg ctg gaa gta 1344 | | | |
| Phe Asp Leu His Ala Glu Ala Glu Thr Gly Lys Arg Met Leu Glu Val | | | |
| | 435 | 440 | 445 |
| gga ggt aat atc aaa gga ata tat gac ctg gga gaa ggc aga tat ggt 1392 | | | |
| Gly Gly Asn Ile Lys Gly Ile Tyr Asp Leu Gly Glu Gly Arg Tyr Gly | | | |
| | 450 | 455 | 460 |
| tca gag gct atc tat gtt ccg cgt gag aca gca gaa gaa gac gac ggt 1440 | | | |
| Ser Glu Ala Ile Tyr Val Pro Arg Glu Thr Ala Glu Glu Asp Asp Gly | | | |
| 465 | 470 | 475 | 480 |
| tac ttg ata ttc ttt gtt cat gat gaa aac aca ggg aaa tca tgc gtg 1488 | | | |
| Tyr Leu Ile Phe Phe Val His Asp Glu Asn Thr Gly Lys Ser Cys Val | | | |
| | 485 | 490 | 495 |

act gtg ata gac gca aaa aca atg tcg gct gaa ccg gtg gca gtg gtg 1536

Thr Val Ile Asp Ala Lys Thr Met Ser Ala Glu Pro Val Ala Val Val

500

505

510

gag ctg ccg cac agg gtc cca tat ggc ttc cat gcc ttg ttt gtt aca 1584

Glu Leu Pro His Arg Val Pro Tyr Gly Phe His Ala Leu Phe Val Thr

515

520

525

gag gaa caa ctc cag gaa caa act ctt ata taa

1617

Glu Glu Gln Leu Gln Glu Gln Thr Leu Ile

530

535

<210> 8

<211> 538

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 8

Met Ala Glu Lys Leu Ser Asp Gly Ser Ser Ile Ile Ser Val His Pro

1

5

10

15

Arg Pro Ser Lys Gly Phe Ser Ser Lys Leu Leu Asp Leu Leu Glu Arg

20

25

30

Leu Val Val Lys Leu Met His Asp Ala Ser Leu Pro Leu His Tyr Leu

35

40

45

Ser Gly Asn Phe Ala Pro Ile Arg Asp Glu Thr Pro Pro Val Lys Asp
50 55 60

Leu Pro Val His Gly Phe Leu Pro Glu Cys Leu Asn Gly Glu Phe Val
65 70 75 80

Arg Val Gly Pro Asn Pro Lys Phe Asp Ala Val Ala Gly Tyr His Trp
85 90 95

Phe Asp Gly Asp Gly Met Ile His Gly Val Arg Ile Lys Asp Gly Lys
100 105 110

Ala Thr Tyr Val Ser Arg Tyr Val Lys Thr Ser Arg Leu Lys Gln Glu
115 120 125

Glu Phe Phe Gly Ala Ala Lys Phe Met Lys Ile Gly Asp Leu Lys Gly
130 135 140

Phe Phe Gly Leu Leu Met Val Asn Val Gln Gln Leu Arg Thr Lys Leu
145 150 155 160

Lys Ile Leu Asp Asn Thr Tyr Gly Asn Gly Thr Ala Asn Thr Ala Leu
165 170 175

Val Tyr His His Gly Lys Leu Leu Ala Leu Gln Glu Ala Asp Lys Pro
180 185 190

Tyr Val Ile Lys Val Leu Glu Asp Gly Asp Leu Gln Thr Leu Gly Ile
195 200 205

Ile Asp Tyr Asp Lys Arg Leu Thr His Ser Phe Thr Ala His Pro Lys
210 215 220

Val Asp Pro Val Thr Gly Glu Met Phe Thr Phe Gly Tyr Ser His Thr
225 230 235 240

Pro Pro Tyr Leu Thr Tyr Arg Val Ile Ser Lys Asp Gly Ile Met His
245 250 255

Asp Pro Val Pro Ile Thr Ile Ser Glu Pro Ile Met Met His Asp Phe
260 265 270

Ala Ile Thr Glu Thr Tyr Ala Ile Phe Met Asp Leu Pro Met His Phe
275 280 285

Arg Pro Lys Glu Met Val Lys Glu Lys Lys Met Ile Tyr Ser Phe Asp
290 295 300

Pro Thr Lys Lys Ala Arg Phe Gly Val Leu Pro Arg Tyr Ala Lys Asp
305 310 315 320

Glu Leu Met Ile Arg Trp Phe Glu Leu Pro Asn Cys Phe Ile Phe His
325 330 335

Asn Ala Asn Ala Trp Glu Glu Glu Asp Glu Val Val Leu Ile Thr Cys
340 345 350

Arg Leu Glu Asn Pro Asp Leu Asp Met Val Ser Gly Lys Val Lys Glu

355

360

365

Lys Leu Glu Asn Phe Gly Asn Glu Leu Tyr Glu Met Arg Phe Asn Met

370

375

380

Lys Thr Gly Ser Ala Ser Gln Lys Lys Leu Ser Ala Ser Ala Val Asp

385

390

395

400

Phe Pro Arg Ile Asn Glu Cys Tyr Thr Gly Lys Lys Gln Arg Tyr Val

405

410

415

Tyr Gly Thr Ile Leu Asp Ser Ile Ala Lys Val Thr Gly Ile Ile Lys

420

425

430

Phe Asp Leu His Ala Glu Ala Glu Thr Gly Lys Arg Met Leu Glu Val

435

440

445

Gly Gly Asn Ile Lys Gly Ile Tyr Asp Leu Gly Glu Gly Arg Tyr Gly

450

455

460

Ser Glu Ala Ile Tyr Val Pro Arg Glu Thr Ala Glu Glu Asp Asp Gly

465

470

475

480

Tyr Leu Ile Phe Phe Val His Asp Glu Asn Thr Gly Lys Ser Cys Val

485

490

495

Thr Val Ile Asp Ala Lys Thr Met Ser Ala Glu Pro Val Ala Val Val

500

505

510

Glu Leu Pro His Arg Val Pro Tyr Gly Phe His Ala Leu Phe Val Thr

515

520

525

Glu Glu Gln Leu Gln Glu Gln Thr Leu Ile

530

535

<210> 9

<211> 1734

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1734)

<400> 9

atg caa cac tct ctt cgt tct gat ctt ctt ccg acg aag act tct cct 48

Met Gln His Ser Leu Arg Ser Asp Leu Leu Pro Thr Lys Thr Ser Pro

1

5

10

15

cgt tct cat tta ctt cca caa ccc aaa aat gca aat att tct cga cga 96

Arg Ser His Leu Leu Pro Gln Pro Lys Asn Ala Asn Ile Ser Arg Arg

20

25

30

att ctc att aac cct ttc aag ata ccg aca ctt cct gat ctc act tct 144

Ile Leu Ile Asn Pro Phe Lys Ile Pro Thr Leu Pro Asp Leu Thr Ser

35

40

45

ccg gtt ccg tca ccg gtt aag ctc aaa cca acg tat cca aac tta aac 192
Pro Val Pro Ser Pro Val Lys Leu Lys Pro Thr Tyr Pro Asn Leu Asn
50 55 60

ctt ctt cag aag cta gcg gct acg atg ctc gac aag att gag tcc tct 240
Leu Leu Gln Lys Leu Ala Ala Thr Met Leu Asp Lys Ile Glu Ser Ser
65 70 75 80

atc gtt att cct atg gag cag aat cgc ccg ctt cct aaa ccg acc gac 288
Ile Val Ile Pro Met Glu Gln Asn Arg Pro Leu Pro Lys Pro Thr Asp
85 90 95

ccg gcg gtt caa tta tca ggt aac ttc gct ccg gtt aat gaa tgt ccg 336
Pro Ala Val Gln Leu Ser Gly Asn Phe Ala Pro Val Asn Glu Cys Pro
100 105 110

gtt cag aac ggt tta gaa gtg gtt ggt cag att cct tct tgt cta aaa 384
Val Gln Asn Gly Leu Glu Val Val Gly Gln Ile Pro Ser Cys Leu Lys
115 120 125

gga gtt tac atc cgt aac ggt gca aac cct atg ttt ccg ccg tta gcc 432
Gly Val Tyr Ile Arg Asn Gly Ala Asn Pro Met Phe Pro Pro Leu Ala
130 135 140

gga cat cat tta ttt gac ggt gac gga atg att cac gcc gtt agt atc 480
Gly His His Leu Phe Asp Gly Asp Gly Met Ile His Ala Val Ser Ile
145 150 155 160

ggt ttt gat aac cag gtt agt tac agc tgc cgg tac act aaa aca aac 528

Gly Phe Asp Asn Gln Val Ser Tyr Ser Cys Arg Tyr Thr Lys Thr Asn

165

170

175

cgg ctt gtt caa gaa acc gcg ctt gga cga tcg gtt ttc cct aaa cca 576

Arg Leu Val Gln Glu Thr Ala Leu Gly Arg Ser Val Phe Pro Lys Pro

180

185

190

atc ggc gag ctt cac ggc cat tcc ggt cta gct cga ctc gct ctc ttc 624

Ile Gly Glu Leu His Gly His Ser Gly Leu Ala Arg Leu Ala Leu Phe

195

200

205

acg gct cga gct ggg atc ggt cta gtg gac ggg aca cgt ggc atg ggc 672

Thr Ala Arg Ala Gly Ile Gly Leu Val Asp Gly Thr Arg Gly Met Gly

210

215

220

gta gct aac gcc ggt gtg gtt ttc ttt aac ggc agg tta tta gcc atg 720

Val Ala Asn Ala Gly Val Val Phe Phe Asn Gly Arg Leu Leu Ala Met

225

230

235

240

tca gaa gat gat ctt cct tac caa gtg aag atc gac ggt caa gga gat 768

Ser Glu Asp Asp Leu Pro Tyr Gln Val Lys Ile Asp Gly Gln Gly Asp

245

250

255

ctt gag acg atc gga cgg ttc gga ttc gat gac cag att gac tct tca 816

Leu Glu Thr Ile Gly Arg Phe Gly Phe Asp Asp Gln Ile Asp Ser Ser

260

265

270

gtg ata gcg cat cct aag gtg gac gcg acc aca gga gat ctc cat aca 864

Val Ile Ala His Pro Lys Val Asp Ala Thr Thr Gly Asp Leu His Thr

| | | | |
|---|-----|-----|------|
| 275 | 280 | 285 | |
| ctg agc tac aac gtt ttg aag aaa cct cat ctc agg tat ctt aaa ttc | | | 912 |
| Leu Ser Tyr Asn Val Leu Lys Lys Pro His Leu Arg Tyr Leu Lys Phe | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| aac acg tgc ggg aaa aag aca cgt gac gtg gag atc acg ctc cct gaa | | | 960 |
| Asn Thr Cys Gly Lys Lys Thr Arg Asp Val Glu Ile Thr Leu Pro Glu | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| cca acg atg att cat gat ttc gcg ata acc gag aat ttt gtc gtt ata | | | 1008 |
| Pro Thr Met Ile His Asp Phe Ala Ile Thr Glu Asn Phe Val Val Ile | | | |
| | 325 | 330 | 335 |
| ccg gat cag caa atg gta ttc aaa tta tcc gaa atg att cgg ggc ggg | | | 1056 |
| Pro Asp Gln Gln Met Val Phe Lys Leu Ser Glu Met Ile Arg Gly Gly | | | |
| | 340 | 345 | 350 |
| tca ccc gtt atc tac gtt aaa gaa aaa atg gcg aga ttt gga gtt ttg | | | 1104 |
| Ser Pro Val Ile Tyr Val Lys Glu Lys Met Ala Arg Phe Gly Val Leu | | | |
| | 355 | 360 | 365 |
| tca aag cag gat ctg acc ggg tcg gat ata aat tgg gtt gat gta ccg | | | 1152 |
| Ser Lys Gln Asp Leu Thr Gly Ser Asp Ile Asn Trp Val Asp Val Pro | | | |
| | 370 | 375 | 380 |
| gat tgt ttc tgt ttc cat cta tgg aat gcg tgg gaa gag aga acc gaa | | | 1200 |
| Asp Cys Phe Cys Phe His Leu Trp Asn Ala Trp Glu Glu Arg Thr Glu | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |

gag gga gac cca gtt atc gtc gta atc ggg tca tgt atg agc cca ccc 1248
Glu Gly Asp Pro Val Ile Val Val Ile Gly Ser Cys Met Ser Pro Pro

405

410

415

gac acg atc ttt agt gaa tca gga gaa cca acc cgg gtt gaa tta agt 1296
Asp Thr Ile Phe Ser Glu Ser Gly Glu Pro Thr Arg Val Glu Leu Ser

420

425

430

gag atc cgg tta aac atg cgt aca aaa gaa tcg aac cgt aag gtt atc 1344
Glu Ile Arg Leu Asn Met Arg Thr Lys Glu Ser Asn Arg Lys Val Ile

435

440

445

gta acc gga gtg aat tta gaa gcg ggt cac ata aac cgt agt tac gtg 1392
Val Thr Gly Val Asn Leu Glu Ala Gly His Ile Asn Arg Ser Tyr Val

450

455

460

ggc cgg aaa agc cag ttc gtt tac ata gca ata gcc gat cct tgg ccc 1440
Gly Arg Lys Ser Gln Phe Val Tyr Ile Ala Ile Ala Asp Pro Trp Pro

465

470

475

480

aaa tgc agt ggc att gcg aag gta gat ata caa aac ggc acc gtt tca 1488
Lys Cys Ser Gly Ile Ala Lys Val Asp Ile Gln Asn Gly Thr Val Ser

485

490

495

gag ttt aat tac gga ccg agc cgg ttc ggt gga gaa ccg tgc ttt gta 1536
Glu Phe Asn Tyr Gly Pro Ser Arg Phe Gly Gly Glu Pro Cys Phe Val

500

505

510

ccg gag gga gaa gga gaa gaa gac aaa ggt tat gta atg ggg ttt gtg 1584
 Pro Glu Gly Glu Gly Glu Glu Asp Lys Gly Tyr Val Met Gly Phe Val
 515 520 525

aga gac gaa gag aaa gac gag tcg gag ttt gtg gtg gtc gac gcg acg 1632
 Arg Asp Glu Glu Lys Asp Glu Ser Glu Phe Val Val Val Asp Ala Thr
 530 535 540

gat atg aag caa gtc gcg gcg gtg cgc ttg ccg gag agg gta cct tat 1680
 Asp Met Lys Gln Val Ala Ala Val Arg Leu Pro Glu Arg Val Pro Tyr
 545 550 555 560

ggt ttc cat gga acg ttc gtg agc gag aat cag ttg aag gaa caa gtt 1728
 Gly Phe His Gly Thr Phe Val Ser Glu Asn Gln Leu Lys Glu Gln Val
 565 570 575

ttc tga 1734
 Phe

<210> 10

<211> 577

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 10

Met Gln His Ser Leu Arg Ser Asp Leu Leu Pro Thr Lys Thr Ser Pro
 1 5 10 15

Arg Ser His Leu Leu Pro Gln Pro Lys Asn Ala Asn Ile Ser Arg Arg
20 25 30

Ile Leu Ile Asn Pro Phe Lys Ile Pro Thr Leu Pro Asp Leu Thr Ser
35 40 45

Pro Val Pro Ser Pro Val Lys Leu Lys Pro Thr Tyr Pro Asn Leu Asn
50 55 60

Leu Leu Gln Lys Leu Ala Ala Thr Met Leu Asp Lys Ile Glu Ser Ser
65 70 75 80

Ile Val Ile Pro Met Glu Gln Asn Arg Pro Leu Pro Lys Pro Thr Asp
85 90 95

Pro Ala Val Gln Leu Ser Gly Asn Phe Ala Pro Val Asn Glu Cys Pro
100 105 110

Val Gln Asn Gly Leu Glu Val Val Gly Gln Ile Pro Ser Cys Leu Lys
115 120 125

Gly Val Tyr Ile Arg Asn Gly Ala Asn Pro Met Phe Pro Pro Leu Ala
130 135 140

Gly His His Leu Phe Asp Gly Asp Gly Met Ile His Ala Val Ser Ile
145 150 155 160

Gly Phe Asp Asn Gln Val Ser Tyr Ser Cys Arg Tyr Thr Lys Thr Asn
165 170 175

Arg Leu Val Gln Glu Thr Ala Leu Gly Arg Ser Val Phe Pro Lys Pro
180 185 190

Ile Gly Glu Leu His Gly His Ser Gly Leu Ala Arg Leu Ala Leu Phe
195 200 205

Thr Ala Arg Ala Gly Ile Gly Leu Val Asp Gly Thr Arg Gly Met Gly
210 215 220

Val Ala Asn Ala Gly Val Val Phe Phe Asn Gly Arg Leu Leu Ala Met
225 230 235 240

Ser Glu Asp Asp Leu Pro Tyr Gln Val Lys Ile Asp Gly Gln Gly Asp
245 250 255

Leu Glu Thr Ile Gly Arg Phe Gly Phe Asp Asp Gln Ile Asp Ser Ser
260 265 270

Val Ile Ala His Pro Lys Val Asp Ala Thr Thr Gly Asp Leu His Thr
275 280 285

Leu Ser Tyr Asn Val Leu Lys Lys Pro His Leu Arg Tyr Leu Lys Phe
290 295 300

Asn Thr Cys Gly Lys Lys Thr Arg Asp Val Glu Ile Thr Leu Pro Glu
305 310 315 320

Pro Thr Met Ile His Asp Phe Ala Ile Thr Glu Asn Phe Val Val Ile

| | | |
|---|-----|-----|
| 325 | 330 | 335 |
| Pro Asp Gln Gln Met Val Phe Lys Leu Ser Glu Met Ile Arg Gly Gly | | |
| 340 | 345 | 350 |
| Ser Pro Val Ile Tyr Val Lys Glu Lys Met Ala Arg Phe Gly Val Leu | | |
| 355 | 360 | 365 |
| Ser Lys Gln Asp Leu Thr Gly Ser Asp Ile Asn Trp Val Asp Val Pro | | |
| 370 | 375 | 380 |
| Asp Cys Phe Cys Phe His Leu Trp Asn Ala Trp Glu Glu Arg Thr Glu | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Glu Gly Asp Pro Val Ile Val Val Ile Gly Ser Cys Met Ser Pro Pro | | |
| 405 | 410 | 415 |
| Asp Thr Ile Phe Ser Glu Ser Gly Glu Pro Thr Arg Val Glu Leu Ser | | |
| 420 | 425 | 430 |
| Glu Ile Arg Leu Asn Met Arg Thr Lys Glu Ser Asn Arg Lys Val Ile | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Val Thr Gly Val Asn Leu Glu Ala Gly His Ile Asn Arg Ser Tyr Val | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Gly Arg Lys Ser Gln Phe Val Tyr Ile Ala Ile Ala Asp Pro Trp Pro | | |
| 465 | 470 | 475 |
| | | 480 |

Lys Cys Ser Gly Ile Ala Lys Val Asp Ile Gln Asn Gly Thr Val Ser
 485 490 495

Glu Phe Asn Tyr Gly Pro Ser Arg Phe Gly Gly Glu Pro Cys Phe Val
 500 505 510

Pro Glu Gly Glu Gly Glu Glu Asp Lys Gly Tyr Val Met Gly Phe Val
 515 520 525

Arg Asp Glu Glu Lys Asp Glu Ser Glu Phe Val Val Val Asp Ala Thr
 530 535 540

Asp Met Lys Gln Val Ala Ala Val Arg Leu Pro Glu Arg Val Pro Tyr
 545 550 555 560

Gly Phe His Gly Thr Phe Val Ser Glu Asn Gln Leu Lys Glu Gln Val
 565 570 575

Phe

<210> 11

<211> 1839

<212> DNA

<213> *Vigna unguiculata*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1839)

<400> 11

atg cct tca tca gct tca aac act tgg ttt aac gcc aca ctc cca tct 48

Met Pro Ser Ser Ala Ser Asn Thr Trp Phe Asn Ala Thr Leu Pro Ser

1

5

10

15

ccc ccc ttc aaa gac cta cct tcc aca tct tct ccc aca aac tta ctt 96

Pro Pro Phe Lys Asp Leu Pro Ser Thr Ser Ser Pro Thr Asn Leu Leu

20

25

30

cct tta agg aaa aca tcc tct tcc aac acc atc aca tgt tcc ctt caa 144

Pro Leu Arg Lys Thr Ser Ser Ser Asn Thr Ile Thr Cys Ser Leu Gln

35

40

45

aca ctc cac ttc ccc aaa cag tac caa cca aca tcc aca tcc aca tcc 192

Thr Leu His Phe Pro Lys Gln Tyr Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Ser

50

55

60

aca gcc acc acc aca aca ccc acc cca atc aaa act acc acc atc acc 240

Thr Ala Thr Thr Thr Thr Pro Thr Pro Ile Lys Thr Thr Thr Ile Thr

65

70

75

80

acc acc aca ccg ccc agg gaa acc aac cct ctc tct gac acc aac caa 288

Thr Thr Thr Pro Pro Arg Glu Thr Asn Pro Leu Ser Asp Thr Asn Gln

85

90

95

cca tta cct caa aaa tgg aac ttt ctc cag aaa gcc gct gcc acg gcc 336

Pro Leu Pro Gln Lys Trp Asn Phe Leu Gln Lys Ala Ala Ala Thr Ala

100

105

110

ttg gac ctg gtc gaa acg gcg ctc gtc tcg cac gag cgc aaa cac ccg 384

Leu Asp Leu Val Glu Thr Ala Leu Val Ser His Glu Arg Lys His Pro

115

120

125

ctc ccc aaa acg gcg gac ccg agg gtc caa atc gcc ggg aac ttc gcg 432

Leu Pro Lys Thr Ala Asp Pro Arg Val Gln Ile Ala Gly Asn Phe Ala

130

135

140

ccg gtg ccg gag cat gcc gcg gat caa gga ctc ccg gtg gtc gga aaa 480

Pro Val Pro Glu His Ala Ala Asp Gln Gly Leu Pro Val Val Gly Lys

145

150

155

160

atc ccc aaa tgc att gac ggc gtg tac gtg cgc aac ggt gcc aat ccg 528

Ile Pro Lys Cys Ile Asp Gly Val Tyr Val Arg Asn Gly Ala Asn Pro

165

170

175

ctc tac gag cct gtg gcc ggg cac cac ttc ttc gac ggc gac ggc atg 576

Leu Tyr Glu Pro Val Ala Gly His His Phe Phe Asp Gly Asp Gly Met

180

185

190

gtc cac gcc gtg aag ttc acg aac ggc gcc gcc agc tac gcc tgc cgc 624

Val His Ala Val Lys Phe Thr Asn Gly Ala Ala Ser Tyr Ala Cys Arg

195

200

205

ttc acc gag acg cag cgt ctc tcg cag gag aaa tct cta ggc cgc ccg 672

Phe Thr Glu Thr Gln Arg Leu Ser Gln Glu Lys Ser Leu Gly Arg Pro

210

215

220

gtg ttc ccg aag gcc atc ggg gag ctc cac ggc cac tcc ggc atc gcg 720
 Val Phe Pro Lys Ala Ile Gly Glu Leu His Gly His Ser Gly Ile Ala
 225 230 235 240

cgg ctc ctc ctc ttc tac gcg cgc ggt ctc ttc ggg ctc gtt gat ggg 768
 Arg Leu Leu Leu Phe Tyr Ala Arg Gly Leu Phe Gly Leu Val Asp Gly
 245 250 255

tcc cag ggc atg ggc gtg gcg aac gcc ggt ctc gtc tac ttc aac aac 816
 Ser Gln Gly Met Gly Val Ala Asn Ala Gly Leu Val Tyr Phe Asn Asn
 260 265 270

cac ctc ttg gcc atg tcc gaa gac gat tta ccc tac cac gtg aga atc 864
 His Leu Leu Ala Met Ser Glu Asp Asp Leu Pro Tyr His Val Arg Ile
 275 280 285

acc cct aac ggc gac tta acc acc gtt ggc cgt tac gac ttc aac ggg 912
 Thr Pro Asn Gly Asp Leu Thr Thr Val Gly Arg Tyr Asp Phe Asn Gly
 290 295 300

cag ctc aac tca aca atg atc gcc cac ccg aaa ctg gac ccc gtc gac 960
 Gln Leu Asn Ser Thr Met Ile Ala His Pro Lys Leu Asp Pro Val Asp
 305 310 315 320

ggc gac ctc cac gcg ctc agc tac gac gtc att cag aag cct tac ctc 1008
 Gly Asp Leu His Ala Leu Ser Tyr Asp Val Ile Gln Lys Pro Tyr Leu
 325 330 335

aag tac ttc cgt ttc tcc ccc gac ggc gtc aag tcc ccc gac gtg gaa 1056

Lys Tyr Phe Arg Phe Ser Pro Asp Gly Val Lys Ser Pro Asp Val Glu
340 345 350

atc ccc ctg aag gag ccc acc atg atg cac gat ttc gcc ata acg gag 1104
Ile Pro Leu Lys Glu Pro Thr Met Met His Asp Phe Ala Ile Thr Glu
355 360 365

aat ttc gtc gtc gtc ccc gac cag cag gtg gtc ttc aaa cta acg gag 1152
Asn Phe Val Val Val Pro Asp Gln Gln Val Val Phe Lys Leu Thr Glu
370 375 380

atg atc acc ggc ggg tcc ccc gtg gtc tac gac aag aac aaa acc tca 1200
Met Ile Thr Gly Gly Ser Pro Val Val Tyr Asp Lys Asn Lys Thr Ser
385 390 395 400

cgg ttt ggg att ctg cac aag aat gcg aag gac gcg aat gcg atg cgg 1248
Arg Phe Gly Ile Leu His Lys Asn Ala Lys Asp Ala Asn Ala Met Arg
405 410 415

tgg atc gac gcg ccg gat tgt ttc tgc ttc cac ctc tgg aac gcg tgg 1296
Trp Ile Asp Ala Pro Asp Cys Phe Cys Phe His Leu Trp Asn Ala Trp
420 425 430

gag gag ccc gaa acc gag gag gtt gtg gtg att ggg tcc tgc atg acc 1344
Glu Glu Pro Glu Thr Glu Glu Val Val Val Ile Gly Ser Cys Met Thr
435 440 445

cct gcg gac tcc att ttc aac gaa tgc gag gag agt ttg aag agc gtg 1392
Pro Ala Asp Ser Ile Phe Asn Glu Cys Glu Glu Ser Leu Lys Ser Val

| | | | |
|---|------|-----|-----|
| 450 | 455 | 460 | |
| ctg tca gag ata agg ctg aac ttg agg acc ggc aag tcc act cgg cgc | 1440 | | |
| Leu Ser Glu Ile Arg Leu Asn Leu Arg Thr Gly Lys Ser Thr Arg Arg | | | |
| 465 | 470 | 475 | 480 |
| ccc att atc tcc gac gcc gaa caa gtg aac ctg gaa gcc ggc atg gtg | 1488 | | |
| Pro Ile Ile Ser Asp Ala Glu Gln Val Asn Leu Glu Ala Gly Met Val | | | |
| | 485 | 490 | 495 |
| aac aga aac aag ctc gga agg aag acc cag ttc gcg tat ctg gct ctg | 1536 | | |
| Asn Arg Asn Lys Leu Gly Arg Lys Thr Gln Phe Ala Tyr Leu Ala Leu | | | |
| | 500 | 505 | 510 |
| gcg gag ccc tgg ccc aaa gtc tcg ggc ttt gcg aaa gtt gat ttg ctg | 1584 | | |
| Ala Glu Pro Trp Pro Lys Val Ser Gly Phe Ala Lys Val Asp Leu Leu | | | |
| | 515 | 520 | 525 |
| agt ggg gaa gtg aag aag tac atg tat gga gaa gag aag ttc ggt ggg | 1632 | | |
| Ser Gly Glu Val Lys Lys Tyr Met Tyr Gly Glu Glu Lys Phe Gly Gly | | | |
| | 530 | 535 | 540 |
| gag cct ctg ttt ctt ccc aac ggc caa aaa gaa gac gat ggg tat att | 1680 | | |
| Glu Pro Leu Phe Leu Pro Asn Gly Gln Lys Glu Asp Asp Gly Tyr Ile | | | |
| | 545 | 550 | 555 |
| | | | 560 |
| ctg gca ttc gtg cac gac gag aaa gaa tgg aaa tcc gag ctg cag att | 1728 | | |
| Leu Ala Phe Val His Asp Glu Lys Glu Trp Lys Ser Glu Leu Gln Ile | | | |
| | 565 | 570 | 575 |

gtg aat gcc caa aat tta aag ctc gaa gct tcc atc aaa ctc ccc tct 1776

Val Asn Ala Gln Asn Leu Lys Leu Glu Ala Ser Ile Lys Leu Pro Ser

580

585

590

cgt gtt ccc tac ggt ttt cat gga act ttc att cat tcc aag gat ttg 1824

Arg Val Pro Tyr Gly Phe His Gly Thr Phe Ile His Ser Lys Asp Leu

595

600

605

agg aaa caa gct tga

1839

Arg Lys Gln Ala

610

<210> 12

<211> 612

<212> PRT

<213> Vigna unguiculata

<400> 12

Met Pro Ser Ser Ala Ser Asn Thr Trp Phe Asn Ala Thr Leu Pro Ser

1

5

10

15

Pro Pro Phe Lys Asp Leu Pro Ser Thr Ser Ser Pro Thr Asn Leu Leu

20

25

30

Pro Leu Arg Lys Thr Ser Ser Ser Asn Thr Ile Thr Cys Ser Leu Gln

35

40

45

Thr Leu His Phe Pro Lys Gln Tyr Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Ser
50 55 60

Thr Ala Thr Thr Thr Thr Pro Thr Pro Ile Lys Thr Thr Thr Ile Thr
65 70 75 80

Thr Thr Thr Pro Pro Arg Glu Thr Asn Pro Leu Ser Asp Thr Asn Gln
85 90 95

Pro Leu Pro Gln Lys Trp Asn Phe Leu Gln Lys Ala Ala Ala Thr Ala
100 105 110

Leu Asp Leu Val Glu Thr Ala Leu Val Ser His Glu Arg Lys His Pro
115 120 125

Leu Pro Lys Thr Ala Asp Pro Arg Val Gln Ile Ala Gly Asn Phe Ala
130 135 140

Pro Val Pro Glu His Ala Ala Asp Gln Gly Leu Pro Val Val Gly Lys
145 150 155 160

Ile Pro Lys Cys Ile Asp Gly Val Tyr Val Arg Asn Gly Ala Asn Pro
165 170 175

Leu Tyr Glu Pro Val Ala Gly His His Phe Phe Asp Gly Asp Gly Met
180 185 190

Val His Ala Val Lys Phe Thr Asn Gly Ala Ala Ser Tyr Ala Cys Arg
195 200 205

Phe Thr Glu Thr Gln Arg Leu Ser Gln Glu Lys Ser Leu Gly Arg Pro
210 215 220

Val Phe Pro Lys Ala Ile Gly Glu Leu His Gly His Ser Gly Ile Ala
225 230 235 240

Arg Leu Leu Leu Phe Tyr Ala Arg Gly Leu Phe Gly Leu Val Asp Gly
245 250 255

Ser Gln Gly Met Gly Val Ala Asn Ala Gly Leu Val Tyr Phe Asn Asn
260 265 270

His Leu Leu Ala Met Ser Glu Asp Asp Leu Pro Tyr His Val Arg Ile
275 280 285

Thr Pro Asn Gly Asp Leu Thr Thr Val Gly Arg Tyr Asp Phe Asn Gly
290 295 300

Gln Leu Asn Ser Thr Met Ile Ala His Pro Lys Leu Asp Pro Val Asp
305 310 315 320

Gly Asp Leu His Ala Leu Ser Tyr Asp Val Ile Gln Lys Pro Tyr Leu
325 330 335

Lys Tyr Phe Arg Phe Ser Pro Asp Gly Val Lys Ser Pro Asp Val Glu
340 345 350

Ile Pro Leu Lys Glu Pro Thr Met Met His Asp Phe Ala Ile Thr Glu

355

360

365

Asn Phe Val Val Val Pro Asp Gln Gln Val Val Phe Lys Leu Thr Glu

370

375

380

Met Ile Thr Gly Gly Ser Pro Val Val Tyr Asp Lys Asn Lys Thr Ser

385

390

395

400

Arg Phe Gly Ile Leu His Lys Asn Ala Lys Asp Ala Asn Ala Met Arg

405

410

415

Trp Ile Asp Ala Pro Asp Cys Phe Cys Phe His Leu Trp Asn Ala Trp

420

425

430

Glu Glu Pro Glu Thr Glu Glu Val Val Val Ile Gly Ser Cys Met Thr

435

440

445

Pro Ala Asp Ser Ile Phe Asn Glu Cys Glu Glu Ser Leu Lys Ser Val

450

455

460

Leu Ser Glu Ile Arg Leu Asn Leu Arg Thr Gly Lys Ser Thr Arg Arg

465

470

475

480

Pro Ile Ile Ser Asp Ala Glu Gln Val Asn Leu Glu Ala Gly Met Val

485

490

495

Asn Arg Asn Lys Leu Gly Arg Lys Thr Gln Phe Ala Tyr Leu Ala Leu

500

505

510

Ala Glu Pro Trp Pro Lys Val Ser Gly Phe Ala Lys Val Asp Leu Leu
515 520 525

Ser Gly Glu Val Lys Lys Tyr Met Tyr Gly Glu Glu Lys Phe Gly Gly
530 535 540

Glu Pro Leu Phe Leu Pro Asn Gly Gln Lys Glu Asp Asp Gly Tyr Ile
545 550 555 560

Leu Ala Phe Val His Asp Glu Lys Glu Trp Lys Ser Glu Leu Gln Ile
565 570 575

Val Asn Ala Gln Asn Leu Lys Leu Glu Ala Ser Ile Lys Leu Pro Ser
580 585 590

Arg Val Pro Tyr Gly Phe His Gly Thr Phe Ile His Ser Lys Asp Leu
595 600 605

Arg Lys Gln Ala
610

<210> 13

<211> 1815.

<212> DNA

<213> Zea mays

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1815)

<400> 13

atg cag ggt ctc gcc ccg ccc acc tct gtt tcc ata cac cgg cac ctg 48

Met Gln Gly Leu Ala Pro Pro Thr Ser Val Ser Ile His Arg His Leu

1

5

10

15

ccg gcc cgg tcc agg gcc cgg gcc tcc aat tcc gtc agg ttc tcg ccg 96

Pro Ala Arg Ser Arg Ala Arg Ala Ser Asn Ser Val Arg Phe Ser Pro

20

25

30

cgc gcc gtc agc tcc gtg ccg ccc gcc gag tgc ctc cag gcg ccg ttc 144

Arg Ala Val Ser Ser Val Pro Pro Ala Glu Cys Leu Gln Ala Pro Phe

35

40

45

cac aag ccc gtc gcc gac ctg cct gcg ccg tcc agg aag ccc gcc gcc 192

His Lys Pro Val Ala Asp Leu Pro Ala Pro Ser Arg Lys Pro Ala Ala

50

55

60

att gcc gtc cca ggg cac gcc gcg gcg ccg agg aaa gcg gag ggc ggc 240

Ile Ala Val Pro Gly His Ala Ala Ala Pro Arg Lys Ala Glu Gly Gly

65

70

75

80

aag aag cag ctc aac ttg ttc cag cgc gcc gcg gcg gcc gcg ctc gac 288

Lys Lys Gln Leu Asn Leu Phe Gln Arg Ala Ala Ala Ala Ala Leu Asp

85

90

95

gcg ttc gag gaa ggg ttc gtg gcc aac gtc ctc gag cgg ccc cac ggg 336

Ala Phe Glu Glu Gly Phe Val Ala Asn Val Leu Glu Arg Pro His Gly

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 100 | 105 | 110 | |
| ctg ccc agc acg gcc gac ccg gcc gtg cag atc gcc ggc aac ttc gcg | | | 384 |
| Leu Pro Ser Thr Ala Asp Pro Ala Val Gln Ile Ala Gly Asn Phe Ala | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| ccc gtc ggg gag agg ccg ccc gtg cac gag ctc ccc gtc tcc ggc cgc | | | 432 |
| Pro Val Gly Glu Arg Pro Pro Val His Glu Leu Pro Val Ser Gly Arg | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| atc ccg ccc ttc atc gac ggg gtc tac gcg cgc aac ggc gcc aac ccc | | | 480 |
| Ile Pro Pro Phe Ile Asp Gly Val Tyr Ala Arg Asn Gly Ala Asn Pro | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| tgc ttc gac ccc gtc gcg ggg cac cac ctc ttc gac ggc gac ggc atg | | | 528 |
| Cys Phe Asp Pro Val Ala Gly His His Leu Phe Asp Gly Asp Gly Met | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| gtg cac gcg ctg cgg ata cgc aac ggc gcc gcc gag tcc tac gcc tgc | | | 576 |
| Val His Ala Leu Arg Ile Arg Asn Gly Ala Ala Glu Ser Tyr Ala Cys | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| cgc ttc acg gag acc gcg cgc ctg cgc cag gag cgc gcg atc ggc cgc | | | 624 |
| Arg Phe Thr Glu Thr Ala Arg Leu Arg Gln Glu Arg Ala Ile Gly Arg | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| ccc gtc ttc ccc aag gcc att ggc gag ctg cac ggg cac tcc ggg atc | | | 672 |
| Pro Val Phe Pro Lys Ala Ile Gly Glu Leu His Gly His Ser Gly Ile | | | |
| 210 | 215 | 220 | |

gcg cgc ctc gcc ctg ttc tac gcg cgc gcc gcg tgc ggc ctc gtg gac 720

Ala Arg Leu Ala Leu Phe Tyr Ala Arg Ala Ala Cys Gly Leu Val Asp

225 230 235 240

ccc tcg gcc ggc acc ggc gtg gcc aac gcc ggc ctc gtc tac ttc aac 768

Pro Ser Ala Gly Thr Gly Val Ala Asn Ala Gly Leu Val Tyr Phe Asn

245 250 255

ggc cgc ctg ctc gcc atg tcc gag gac gac ctc ccc tac cac gtc cgc 816

Gly Arg Leu Leu Ala Met Ser Glu Asp Asp Leu Pro Tyr His Val Arg

260 265 270

gtg gcg gac gac ggc gac ctc gag acc gtc ggc cgc tac gac ttc gac 864

Val Ala Asp Asp Gly Asp Leu Glu Thr Val Gly Arg Tyr Asp Phe Asp

275 280 285

ggg cag ctc ggc tgc gcc atg atc gcg cac ccc aag ctg gac ccg gcc 912

Gly Gln Leu Gly Cys Ala Met Ile Ala His Pro Lys Leu Asp Pro Ala

290 295 300

acc ggg gag ctc cac gcg ctc agc tac gac gtc atc aag agg ccg tac 960

Thr Gly Glu Leu His Ala Leu Ser Tyr Asp Val Ile Lys Arg Pro Tyr

305 310 315 320

ctc aag tac ttc tac ttc agg ccc gac ggc acc aag tcc gac gac gtg 1008

Leu Lys Tyr Phe Tyr Phe Arg Pro Asp Gly Thr Lys Ser Asp Asp Val

325 330 335

gag atc ccg ctg gag cag ccc acg atg atc cac gac ttc gcc atc acc 1056

Glu Ile Pro Leu Glu Gln Pro Thr Met Ile His Asp Phe Ala Ile Thr

340

345

350

gag aac ttc gtg gtt gtg ccc gac cac cag gtg gtg ttc aag ctc cag 1104

Glu Asn Phe Val Val Val Pro Asp His Gln Val Val Phe Lys Leu Gln

355

360

365

gag atg ctg cgc ggc ggg tcg ccc gtg gtg ctg gac aag gag aag acg 1152

Glu Met Leu Arg Gly Gly Ser Pro Val Val Leu Asp Lys Glu Lys Thr

370

375

380

tcg cgg ttc ggc gtg ctc ccc aag cac gcc gcg gac gcg tcg gag atg 1200

Ser Arg Phe Gly Val Leu Pro Lys His Ala Ala Asp Ala Ser Glu Met

385

390

395

400

gcg tgg gtg gac gtg ccg gac tgc ttc tgc ttc cac ctg tgg aac gcg 1248

Ala Trp Val Asp Val Pro Asp Cys Phe Cys Phe His Leu Trp Asn Ala

405

410

415

tgg gag gac gag gcg acg ggc gag gtg gtg gtg atc ggc tcc tgc atg 1296

Trp Glu Asp Glu Ala Thr Gly Glu Val Val Val Ile Gly Ser Cys Met

420

425

430

acc ccc gcc gac tcc atc ttc aac gag tcc gac gag cgc ctg gag agc 1344

Thr Pro Ala Asp Ser Ile Phe Asn Glu Ser Asp Glu Arg Leu Glu Ser

435

440

445

gtg ctg acc gag atc cgc ctg gac gcg cgc acg ggc cgg tcc acg cgc 1392

Val Leu Thr Glu Ile Arg Leu Asp Ala Arg Thr Gly Arg Ser Thr Arg

450

455

460

cgc gcc gtc ctg ccg ccg tcg cag cag gag aac ctg gag gtg ggc atg 1440

Arg Ala Val Leu Pro Pro Ser Gln Gln Glu Asn Leu Glu Val Gly Met

465

470

475

480

gtg aac cgc aac ctg ctg ggc cgc gag agc cgg tac gcg tac ctc gcg 1488

Val Asn Arg Asn Leu Leu Gly Arg Glu Ser Arg Tyr Ala Tyr Leu Ala

485

490

495

gtg gcg gag ccg tgg ccc aag gag tcg ggc ttc gcc aag gag gac ctg 1536

Val Ala Glu Pro Trp Pro Lys Glu Ser Gly Phe Ala Lys Glu Asp Leu

500

505

510

tcc acg ggc gag ctc acc aag ttc gag tac ggc gag ggc cgg ttc ggc 1584

Ser Thr Gly Glu Leu Thr Lys Phe Glu Tyr Gly Glu Gly Arg Phe Gly

515

520

525

ggc gag ccc tgc ttc gtt ccc atg gac ccg gcc gcg gcc cac ccg cgc 1632

Gly Glu Pro Cys Phe Val Pro Met Asp Pro Ala Ala Ala His Pro Arg

530

535

540

ggc gag gac gac ggg tac gtg ctc acc ttc gtc cac gac gag cgc gcc 1680

Gly Glu Asp Asp Gly Tyr Val Leu Thr Phe Val His Asp Glu Arg Ala

545

550

555

560

ggc acg tcg gag cta ctt gtg gtc aat gcc gcc gac atc cgg ctg gag 1728

Gly Thr Ser Glu Leu Leu Val Val Asn Ala Ala Asp Ile Arg Leu Glu

565

570

575

gcc acg gtt cag ctg ccg tcc cgc gtg ccc ttc ggc ttc cac ggc acc 1776

Ala Thr Val Gln Leu Pro Ser Arg Val Pro Phe Gly Phe His Gly Thr

580

585

590

ttc atc acg ggc cag gag ctc gag gcc cag gcg gcc tga

1815

Phe Ile Thr Gly Gln Glu Leu Glu Ala Gln Ala Ala

595

600

605

<210> 14

<211> 604

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 14

Met Gln Gly Leu Ala Pro Pro Thr Ser Val Ser Ile His Arg His Leu

1

5

10

15

Pro Ala Arg Ser Arg Ala Arg Ala Ser Asn Ser Val Arg Phe Ser Pro

20

25

30

Arg Ala Val Ser Ser Val Pro Pro Ala Glu Cys Leu Gln Ala Pro Phe

35

40

45

His Lys Pro Val Ala Asp Leu Pro Ala Pro Ser Arg Lys Pro Ala Ala

50

55

60

Ile Ala Val Pro Gly His Ala Ala Ala Pro Arg Lys Ala Glu Gly Gly
65 70 75 80

Lys Lys Gln Leu Asn Leu Phe Gln Arg Ala Ala Ala Ala Ala Leu Asp
85 90 95

Ala Phe Glu Glu Gly Phe Val Ala Asn Val Leu Glu Arg Pro His Gly
100 105 110

Leu Pro Ser Thr Ala Asp Pro Ala Val Gln Ile Ala Gly Asn Phe Ala
115 120 125

Pro Val Gly Glu Arg Pro Pro Val His Glu Leu Pro Val Ser Gly Arg
130 135 140

Ile Pro Pro Phe Ile Asp Gly Val Tyr Ala Arg Asn Gly Ala Asn Pro
145 150 155 160

Cys Phe Asp Pro Val Ala Gly His His Leu Phe Asp Gly Asp Gly Met
165 170 175

Val His Ala Leu Arg Ile Arg Asn Gly Ala Ala Glu Ser Tyr Ala Cys
180 185 190

Arg Phe Thr Glu Thr Ala Arg Leu Arg Gln Glu Arg Ala Ile Gly Arg
195 200 205

Pro Val Phe Pro Lys Ala Ile Gly Glu Leu His Gly His Ser Gly Ile
210 215 220

Ala Arg Leu Ala Leu Phe Tyr Ala Arg Ala Ala Cys Gly Leu Val Asp
225 230 235 240

Pro Ser Ala Gly Thr Gly Val Ala Asn Ala Gly Leu Val Tyr Phe Asn
245 250 255

Gly Arg Leu Leu Ala Met Ser Glu Asp Asp Leu Pro Tyr His Val Arg
260 265 270

Val Ala Asp Asp Gly Asp Leu Glu Thr Val Gly Arg Tyr Asp Phe Asp
275 280 285

Gly Gln Leu Gly Cys Ala Met Ile Ala His Pro Lys Leu Asp Pro Ala
290 295 300

Thr Gly Glu Leu His Ala Leu Ser Tyr Asp Val Ile Lys Arg Pro Tyr
305 310 315 320

Leu Lys Tyr Phe Tyr Phe Arg Pro Asp Gly Thr Lys Ser Asp Asp Val
325 330 335

Glu Ile Pro Leu Glu Gln Pro Thr Met Ile His Asp Phe Ala Ile Thr
340 345 350

Glu Asn Phe Val Val Val Pro Asp His Gln Val Val Phe Lys Leu Gln
355 360 365

Glu Met Leu Arg Gly Gly Ser Pro Val Val Leu Asp Lys Glu Lys Thr

| | | |
|---|-----|---------|
| 370 | 375 | 380 |
| Ser Arg Phe Gly Val Leu Pro Lys His Ala Ala Asp Ala Ser Glu Met | | |
| 385 | 390 | 395 400 |
| Ala Trp Val Asp Val Pro Asp Cys Phe Cys Phe His Leu Trp Asn Ala | | |
| 405 | 410 | 415 |
| Trp Glu Asp Glu Ala Thr Gly Glu Val Val Val Ile Gly Ser Cys Met | | |
| 420 | 425 | 430 |
| Thr Pro Ala Asp Ser Ile Phe Asn Glu Ser Asp Glu Arg Leu Glu Ser | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Val Leu Thr Glu Ile Arg Leu Asp Ala Arg Thr Gly Arg Ser Thr Arg | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Arg Ala Val Leu Pro Pro Ser Gln Gln Glu Asn Leu Glu Val Gly Met | | |
| 465 | 470 | 475 480 |
| Val Asn Arg Asn Leu Leu Gly Arg Glu Ser Arg Tyr Ala Tyr Leu Ala | | |
| 485 | 490 | 495 |
| Val Ala Glu Pro Trp Pro Lys Glu Ser Gly Phe Ala Lys Glu Asp Leu | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Ser Thr Gly Glu Leu Thr Lys Phe Glu Tyr Gly Glu Gly Arg Phe Gly | | |
| 515 | 520 | 525 |

Gly Glu Pro Cys Phe Val Pro Met Asp Pro Ala Ala Ala His Pro Arg

530

535

540

Gly Glu Asp Asp Gly Tyr Val Leu Thr Phe Val His Asp Glu Arg Ala

545

550

555

560

Gly Thr Ser Glu Leu Leu Val Val Asn Ala Ala Asp Ile Arg Leu Glu

565

570

575

Ala Thr Val Gln Leu Pro Ser Arg Val Pro Phe Gly Phe His Gly Thr

580

585

590

Phe Ile Thr Gly Gln Glu Leu Glu Ala Gln Ala Ala

595

600

<210> 15

<211> 1818

<212> DNA

<213> Lycopersicon esculentum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1818)

<400> 15

atg gca act act act tca cat gcc aca aat aca tgg att aag act aag 48

Met Ala Thr Thr Thr Ser His Ala Thr Asn Thr Trp Ile Lys Thr Lys

1

5

10

15

ttg tca atg cca tca tca aag gag ttt ggt ttt gca tca aac tct att 96
Leu Ser Met Pro Ser Ser Lys Glu Phe Gly Phe Ala Ser Asn Ser Ile

20

25

30

tct cta ctc aaa aat caa cat aat agg caa agt ctc aac att aat tcc 144
Ser Leu Leu Lys Asn Gln His Asn Arg Gln Ser Leu Asn Ile Asn Ser

35

40

45

tct ctt caa gct cca cct ata ctt cat ttt cct aaa caa tct tca aat 192
Ser Leu Gln Ala Pro Pro Ile Leu His Phe Pro Lys Gln Ser Ser Asn

50

55

60

tat caa aca cca aag aat aat aca att tca cac cca aaa caa gaa aac 240
Tyr Gln Thr Pro Lys Asn Asn Thr Ile Ser His Pro Lys Gln Glu Asn

65

70

75

80

aac aac tcc tct tct tct tca act tcc aag tgg aat tta gtg cag aaa 288
Asn Asn Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ser Lys Trp Asn Leu Val Gln Lys

85

90

95

gca gca gca atg gct tta gat gct gta gaa agt gct tta act aaa cat 336
Ala Ala Ala Met Ala Leu Asp Ala Val Glu Ser Ala Leu Thr Lys His

100

105

110

gaa ctt gaa cac cct ttg ccg aaa aca gcc gac cca cga gtc cag att 384
Glu Leu Glu His Pro Leu Pro Lys Thr Ala Asp Pro Arg Val Gln Ile

115

120

125

tct ggg aat ttt gct ccg gta ccg gaa aat cca gtc tgt caa tct ctt 432
Ser Gly Asn Phe Ala Pro Val Pro Glu Asn Pro Val Cys Gln Ser Leu

130

135

140

ccg gtc acc gga aaa ata ccc aaa tgt gtt caa ggc gtt tac gtt cga 480
Pro Val Thr Gly Lys Ile Pro Lys Cys Val Gln Gly Val Tyr Val Arg

145

150

155

160

aac gga gct aac cct ctt ttt gaa cca acc gcc gga cac cat ttc ttc 528
Asn Gly Ala Asn Pro Leu Phe Glu Pro Thr Ala Gly His His Phe Phe

165

170

175

gac ggc gac ggt atg gtt cac gcc gtt caa ttc aaa aat ggg tcg gct 576
Asp Gly Asp Gly Met Val His Ala Val Gln Phe Lys Asn Gly Ser Ala

180

185

190

agt tac gct tgc cgt ttc act gaa aca gag agg ctt gtt caa gaa aaa 624
Ser Tyr Ala Cys Arg Phe Thr Glu Thr Glu Arg Leu Val Gln Glu Lys

195

200

205

gct ttg ggt cgc cct gtt ttc cct aaa gcc att ggt gaa tta cat ggt 672
Ala Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro Lys Ala Ile Gly Glu Leu His Gly

210

215

220

cac tct gga att gca agg ctt atg ctg ttt tac gct cgt ggg ctc ttc 720
His Ser Gly Ile Ala Arg Leu Met Leu Phe Tyr Ala Arg Gly Leu Phe

225

230

235

240

gga ctt gtt gat cac agt aaa gga act ggt gtt gca aac gcc ggt tta 768

Gly Leu Val Asp His Ser Lys Gly Thr Gly Val Ala Asn Ala Gly Leu
 245 250 255

gtc tat ttc aat aac cga tta ctt gct atg tct gaa gat gat ttg cct 816
 Val Tyr Phe Asn Asn Arg Leu Leu Ala Met Ser Glu Asp Asp Leu Pro
 260 265 270

tac cat gta aag gta aca ccc acc ggc gat ctt aaa aca gag ggt cga 864
 Tyr His Val Lys Val Thr Pro Thr Gly Asp Leu Lys Thr Glu Gly Arg
 275 280 285

ttc gat ttc gac ggc cag cta aaa tcc acc atg ata gct cac cca aag 912
 Phe Asp Phe Asp Gly Gln Leu Lys Ser Thr Met Ile Ala His Pro Lys
 290 295 300

ctc gac cca gtt tcc ggt gag cta ttt gct ctt agc tac gat gtg att 960
 Leu Asp Pro Val Ser Gly Glu Leu Phe Ala Leu Ser Tyr Asp Val Ile
 305 310 315 320

cag aag cca tac ctc aag tac ttc aga ttt tca aaa aat ggg gaa aaa 1008
 Gln Lys Pro Tyr Leu Lys Tyr Phe Arg Phe Ser Lys Asn Gly Glu Lys
 325 330 335

tca aat gat gtt gaa att cca gtt gaa gac cca aca atg atg cat gat 1056
 Ser Asn Asp Val Glu Ile Pro Val Glu Asp Pro Thr Met Met His Asp
 340 345 350

ttc gca att act gag aac ttc gtc gtc att cct gat caa caa gtc gtt 1104
 Phe Ala Ile Thr Glu Asn Phe Val Val Ile Pro Asp Gln Gln Val Val

| | | | |
|--|-----|-----|--|
| 355 | 360 | 365 | |
| ttc aag atg tct gaa atg atc cgt gga ggt tca ccg gtg gtt tac gac 1152 Phe Lys Met Ser Glu Met Ile Arg Gly Gly Ser Pro Val Val Tyr Asp 370 375 380 | | | |
| aag aac aaa gtt tcc cga ttt ggt att ctg gat aag tac gcg aaa gat 1200 Lys Asn Lys Val Ser Arg Phe Gly Ile Leu Asp Lys Tyr Ala Lys Asp 385 390 395 400 | | | |
| ggg tct gat ttg aaa tgg gtt gaa gta cct gat tgt ttc tgt ttc cac 1248 Gly Ser Asp Leu Lys Trp Val Glu Val Pro Asp Cys Phe Cys Phe His 405 410 415 | | | |
| ctc tgg aat gct tgg gaa gaa gca gaa aca gat gaa atc gtt gta att 1296 Leu Trp Asn Ala Trp Glu Glu Ala Glu Thr Asp Glu Ile Val Val Ile 420 425 430 | | | |
| ggt tca tgt atg aca cca cca gac tcc att ttc aat gaa tgt gat gaa 1344 Gly Ser Cys Met Thr Pro Pro Asp Ser Ile Phe Asn Glu Cys Asp Glu 435 440 445 | | | |
| ggg cta aag agt gtt tta tcc gaa atc cgt ctc aat ttg aaa aca ggg 1392 Gly Leu Lys Ser Val Leu Ser Glu Ile Arg Leu Asn Leu Lys Thr Gly 450 455 460 | | | |
| aaa tca aca aga aaa tcc ata atc gaa aac ccg gat gaa caa gtg aat 1440 Lys Ser Thr Arg Lys Ser Ile Ile Glu Asn Pro Asp Glu Gln Val Asn 465 470 475 480 | | | |

tta gaa gct gga atg gtg aac cga aac aaa ctc gga agg aaa aca gag 1488

Leu Glu Ala Gly Met Val Asn Arg Asn Lys Leu Gly Arg Lys Thr Glu

485

490

495

tat gct tat ttg gct atc gct gaa cca tgg cca aaa gtt tct ggt ttt 1536

Tyr Ala Tyr Leu Ala Ile Ala Glu Pro Trp Pro Lys Val Ser Gly Phe

500

505

510

gca aaa gta aac ctg ttc acc ggt gaa gtt gag aaa ttc att tat ggt 1584

Ala Lys Val Asn Leu Phe Thr Gly Glu Val Glu Lys Phe Ile Tyr Gly

515

520

525

gac aac aaa tat ggt ggg gaa cct ctt ttt tta cca aga gac ccc aac 1632

Asp Asn Lys Tyr Gly Gly Glu Pro Leu Phe Leu Pro Arg Asp Pro Asn

530

535

540

agc aag gaa gaa gac gat ggt tat att tta gct ttc gtt cac gat gag 1680

Ser Lys Glu Glu Asp Asp Gly Tyr Ile Leu Ala Phe Val His Asp Glu

545

550

555

560

aaa gaa tgg aaa tca gaa ctg caa att gtt aac gca atg agt ttg aag 1728

Lys Glu Trp Lys Ser Glu Leu Gln Ile Val Asn Ala Met Ser Leu Lys

565

570

575

ttg gag gca act gtg aag ctt cca tca aga gtt cct tat gga ttt cat 1776

Leu Glu Ala Thr Val Lys Leu Pro Ser Arg Val Pro Tyr Gly Phe His

580

585

590

gga aca ttc ata aac gcc aat gat ttg gca aat cag gca tga 1818

Gly Thr Phe Ile Asn Ala Asn Asp Leu Ala Asn Gln Ala

595

600

605

<210> 16

<211> 605

<212> PRT

<213> Lycopersicon esculentum

<400> 16

Met Ala Thr Thr Thr Ser His Ala Thr Asn Thr Trp Ile Lys Thr Lys

1

5

10

15

Leu Ser Met Pro Ser Ser Lys Glu Phe Gly Phe Ala Ser Asn Ser Ile

20

25

30

Ser Leu Leu Lys Asn Gln His Asn Arg Gln Ser Leu Asn Ile Asn Ser

35

40

45

Ser Leu Gln Ala Pro Pro Ile Leu His Phe Pro Lys Gln Ser Ser Asn

50

55

60

Tyr Gln Thr Pro Lys Asn Asn Thr Ile Ser His Pro Lys Gln Glu Asn

65

70

75

80

Asn Asn Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ser Lys Trp Asn Leu Val Gln Lys

85

90

95

Ala Ala Ala Met Ala Leu Asp Ala Val Glu Ser Ala Leu Thr Lys His
100 105 110

Glu Leu Glu His Pro Leu Pro Lys Thr Ala Asp Pro Arg Val Gln Ile
115 120 125

Ser Gly Asn Phe Ala Pro Val Pro Glu Asn Pro Val Cys Gln Ser Leu
130 135 140

Pro Val Thr Gly Lys Ile Pro Lys Cys Val Gln Gly Val Tyr Val Arg
145 150 155 160

Asn Gly Ala Asn Pro Leu Phe Glu Pro Thr Ala Gly His His Phe Phe
165 170 175

Asp Gly Asp Gly Met Val His Ala Val Gln Phe Lys Asn Gly Ser Ala
180 185 190

Ser Tyr Ala Cys Arg Phe Thr Glu Thr Glu Arg Leu Val Gln Glu Lys
195 200 205

Ala Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro Lys Ala Ile Gly Glu Leu His Gly
210 215 220

His Ser Gly Ile Ala Arg Leu Met Leu Phe Tyr Ala Arg Gly Leu Phe
225 230 235 240

Gly Leu Val Asp His Ser Lys Gly Thr Gly Val Ala Asn Ala Gly Leu
245 250 255

Val Tyr Phe Asn Asn Arg Leu Leu Ala Met Ser Glu Asp Asp Leu Pro
260 265 270

Tyr His Val Lys Val Thr Pro Thr Gly Asp Leu Lys Thr Glu Gly Arg
275 280 285

Phe Asp Phe Asp Gly Gln Leu Lys Ser Thr Met Ile Ala His Pro Lys
290 295 300

Leu Asp Pro Val Ser Gly Glu Leu Phe Ala Leu Ser Tyr Asp Val Ile
305 310 315 320

Gln Lys Pro Tyr Leu Lys Tyr Phe Arg Phe Ser Lys Asn Gly Glu Lys
325 330 335

Ser Asn Asp Val Glu Ile Pro Val Glu Asp Pro Thr Met Met His Asp
340 345 350

Phe Ala Ile Thr Glu Asn Phe Val Val Ile Pro Asp Gln Gln Val Val
355 360 365

Phe Lys Met Ser Glu Met Ile Arg Gly Gly Ser Pro Val Val Tyr Asp
370 375 380

Lys Asn Lys Val Ser Arg Phe Gly Ile Leu Asp Lys Tyr Ala Lys Asp
385 390 395 400

Gly Ser Asp Leu Lys Trp Val Glu Val Pro Asp Cys Phe Cys Phe His

| | | |
|---|-----|-----|
| 405 | 410 | 415 |
| Leu Trp Asn Ala Trp Glu Glu Ala Glu Thr Asp Glu Ile Val Val Ile | | |
| 420 | 425 | 430 |
| Gly Ser Cys Met Thr Pro Pro Asp Ser Ile Phe Asn Glu Cys Asp Glu | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Gly Leu Lys Ser Val Leu Ser Glu Ile Arg Leu Asn Leu Lys Thr Gly | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Lys Ser Thr Arg Lys Ser Ile Ile Glu Asn Pro Asp Glu Gln Val Asn | | |
| 465 | 470 | 475 |
| 480 | | |
| Leu Glu Ala Gly Met Val Asn Arg Asn Lys Leu Gly Arg Lys Thr Glu | | |
| 485 | 490 | 495 |
| Tyr Ala Tyr Leu Ala Ile Ala Glu Pro Trp Pro Lys Val Ser Gly Phe | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Ala Lys Val Asn Leu Phe Thr Gly Glu Val Glu Lys Phe Ile Tyr Gly | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Asp Asn Lys Tyr Gly Gly Glu Pro Leu Phe Leu Pro Arg Asp Pro Asn | | |
| 530 | 535 | 540 |
| Ser Lys Glu Glu Asp Asp Gly Tyr Ile Leu Ala Phe Val His Asp Glu | | |
| 545 | 550 | 555 |
| 560 | | |

Lys Glu Trp Lys Ser Glu Leu Gln Ile Val Asn Ala Met Ser Leu Lys

565

570

575

Leu Glu Ala Thr Val Lys Leu Pro Ser Arg Val Pro Tyr Gly Phe His

580

585

590

Gly Thr Phe Ile Asn Ala Asn Asp Leu Ala Asn Gln Ala

595

600

605

<210> 17

<211> 1617

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1617)

<400> 17

atg gcg gag aaa ctc agt gat ggc agc atc atc atc tca gtc cat cct 48

Met Ala Glu Lys Leu Ser Asp Gly Ser Ile Ile Ile Ser Val His Pro

1

5

10

15

aga ccc tcc aag ggt ttc tcc tcg aag ctt ctc gat ctt ctc gag aga 96

Arg Pro Ser Lys Gly Phe Ser Ser Lys Leu Leu Asp Leu Leu Glu Arg

20

25

30

ctt gtc gtc aag ctc atg cac gat gct tct ctc cct ctc cac tac ctc 144

Leu Val Val Lys Leu Met His Asp Ala Ser Leu Pro Leu His Tyr Leu

35

40

45

tca ggc aac ttc gct ccc atc cgt gat gaa act cct ccc gtc aag gat 192

Ser Gly Asn Phe Ala Pro Ile Arg Asp Glu Thr Pro Pro Val Lys Asp

50

55

60

ctc ccc gtc cat gga ttt ctt ccc gaa tgc ttg aat ggt gaa ttt gtg 240

Leu Pro Val His Gly Phe Leu Pro Glu Cys Leu Asn Gly Glu Phe Val

65

70

75

80

agg gtt ggt cca aac ccc aag ttt gat gct gtc gct gga tat cac tgg 288

Arg Val Gly Pro Asn Pro Lys Phe Asp Ala Val Ala Gly Tyr His Trp

85

90

95

ttt gat gga gat ggg atg att cat ggg gta cgc atc aaa gat ggg aaa 336

Phe Asp Gly Asp Gly Met Ile His Gly Val Arg Ile Lys Asp Gly Lys

100

105

110

gct act tat gtt tct cga tat gtt aag aca tca cgt ctt aag cag gaa 384

Ala Thr Tyr Val Ser Arg Tyr Val Lys Thr Ser Arg Leu Lys Gln Glu

115

120

125

gag ttc ttc gga gct gcc aaa ttc atg aag att ggt gac ctt aag ggg 432

Glu Phe Phe Gly Ala Ala Lys Phe Met Lys Ile Gly Asp Leu Lys Gly

130

135

140

ttt ttc gga ttg cta atg gtc aat atc caa cag ctg aga acg aag ctc 480

Phe Phe Gly Leu Leu Met Val Asn Ile Gln Gln Leu Arg Thr Lys Leu

| | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|
| 145 | 150 | 155 | 160 | |
| aaa ata ttg gac aac act tat gga aat gga act gcc aat aca gca ctc | | | | 528 |
| Lys Ile Leu Asp Asn Thr Tyr Gly Asn Gly Thr Ala Asn Thr Ala Leu | | | | |
| | 165 | 170 | 175 | |
| gta tat cac cat gga aaa ctt cta gca tta cag gag gca gat aag ccg | | | | 576 |
| Val Tyr His His Gly Lys Leu Leu Ala Leu Gln Glu Ala Asp Lys Pro | | | | |
| | 180 | 185 | 190 | |
| tac gtc atc aaa gtt ttg gaa gat gga gac ctg caa act ctt ggt ata | | | | 624 |
| Tyr Val Ile Lys Val Leu Glu Asp Gly Asp Leu Gln Thr Leu Gly Ile | | | | |
| | 195 | 200 | 205 | |
| ata gat tat gac aag aga ttg acc cac tcc ttc act gct cac cca aaa | | | | 672 |
| Ile Asp Tyr Asp Lys Arg Leu Thr His Ser Phe Thr Ala His Pro Lys | | | | |
| | 210 | 215 | 220 | |
| gtt gac ccg gtt acg ggt gaa atg ttt aca ttc ggc tat tcg cat acg | | | | 720 |
| Val Asp Pro Val Thr Gly Glu Met Phe Thr Phe Gly Tyr Ser His Thr | | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 | |
| cca cct tat ctc aca tac aga gtt atc tcg aaa gat ggc att atg cat | | | | 768 |
| Pro Pro Tyr Leu Thr Tyr Arg Val Ile Ser Lys Asp Gly Ile Met His | | | | |
| | 245 | 250 | 255 | |
| gac cca gtc cca att act ata tca gag cct atc atg atg cat gat ttt | | | | 816 |
| Asp Pro Val Pro Ile Thr Ile Ser Glu Pro Ile Met Met His Asp Phe | | | | |
| | 260 | 265 | 270 | |

gct att act gag act tat gca atc ttc atg gat ctt cct atg cac ttc 864

Ala Ile Thr Glu Thr Tyr Ala Ile Phe Met Asp Leu Pro Met His Phe

275

280

285

agg cca aag gaa atg gtg aaa gag aag aaa atg ata tac tca ttt gat 912

Arg Pro Lys Glu Met Val Lys Glu Lys Lys Met Ile Tyr Ser Phe Asp

290

295

300

ccc aca aaa aag gct cgt ttt ggt gtt ctt ccg cgc tat gcc aag gat 960

Pro Thr Lys Lys Ala Arg Phe Gly Val Leu Pro Arg Tyr Ala Lys Asp

305

310

315

320

gaa ctt atg att aga tgg ttt gag ctt ccc aac tgc ttt att ttc cac 1008

Glu Leu Met Ile Arg Trp Phe Glu Leu Pro Asn Cys Phe Ile Phe His

325

330

335

aac gcc aat gct tgg gaa gaa gag gat gaa gtc gtc ctc atc act tgt 1056

Asn Ala Asn Ala Trp Glu Glu Glu Asp Glu Val Val Leu Ile Thr Cys

340

345

350

cgt ctt gag aat cca gat ctt gac atg gtc agt ggg aaa gtg aaa gaa 1104

Arg Leu Glu Asn Pro Asp Leu Asp Met Val Ser Gly Lys Val Lys Glu

355

360

365

aaa ctc gaa aat ttt ggc aac gaa ctg tac gaa atg aga ttc aac atg 1152

Lys Leu Glu Asn Phe Gly Asn Glu Leu Tyr Glu Met Arg Phe Asn Met

370

375

380

aaa acg ggc tca gct tct caa aaa aaa cta tcc gca tct gcg gtt gat 1200
 Lys Thr Gly Ser Ala Ser Gln Lys Lys Leu Ser Ala Ser Ala Val Asp
 385 390 395 400

ttc ccc aga atc aat gag tgc tac acc gga aag aaa cag aga tac gta 1248
 Phe Pro Arg Ile Asn Glu Cys Tyr Thr Gly Lys Lys Gln Arg Tyr Val
 405 410 415

tat gga aca att ctg gac agt atc gca aag gtt acc gga atc atc aag 1296
 Tyr Gly Thr Ile Leu Asp Ser Ile Ala Lys Val Thr Gly Ile Ile Lys
 420 425 430

ttt gat ctg cat gca gaa gct gag aca ggg aaa aga atg ctg gaa gta 1344
 Phe Asp Leu His Ala Glu Ala Glu Thr Gly Lys Arg Met Leu Glu Val
 435 440 445

gga ggt aat atc aaa gga ata tat gac ctg gga gaa ggc aga tat ggt 1392
 Gly Gly Asn Ile Lys Gly Ile Tyr Asp Leu Gly Glu Gly Arg Tyr Gly
 450 455 460

tca gag gct atc tat gtt ccg cgt gag aca gca gaa gaa gac gac ggt 1440
 Ser Glu Ala Ile Tyr Val Pro Arg Glu Thr Ala Glu Glu Asp Asp Gly
 465 470 475 480

tac ttg ata ttc ttt gtt cat gat gaa aac aca ggg aaa tca tgc gtg 1488
 Tyr Leu Ile Phe Phe Val His Asp Glu Asn Thr Gly Lys Ser Cys Val
 485 490 495

act gtg ata gac gca aaa aca atg tcg gct gaa ccg gtg gca gtg gtg 1536

Thr Val Ile Asp Ala Lys Thr Met Ser Ala Glu Pro Val Ala Val Val

500

505

510

gag ctg ccg cac agg gtc cca tat ggc ttc cat gcc ttg ttt gtt aca 1584

Glu Leu Pro His Arg Val Pro Tyr Gly Phe His Ala Leu Phe Val Thr

515

520

525

gag gaa caa ctc cag gaa caa act ctt ata taa

1617

Glu Glu Gln Leu Gln Glu Gln Thr Leu Ile

530

535

<210> 18

<211> 538

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 18

Met Ala Glu Lys Leu Ser Asp Gly Ser Ile Ile Ile Ser Val His Pro

1

5

10

15

Arg Pro Ser Lys Gly Phe Ser Ser Lys Leu Leu Asp Leu Leu Glu Arg

20

25

30

Leu Val Val Lys Leu Met His Asp Ala Ser Leu Pro Leu His Tyr Leu

35

40

45

Ser Gly Asn Phe Ala Pro Ile Arg Asp Glu Thr Pro Pro Val Lys Asp

50

55

60

Leu Pro Val His Gly Phe Leu Pro Glu Cys Leu Asn Gly Glu Phe Val
65 70 75 80

Arg Val Gly Pro Asn Pro Lys Phe Asp Ala Val Ala Gly Tyr His Trp
85 90 95

Phe Asp Gly Asp Gly Met Ile His Gly Val Arg Ile Lys Asp Gly Lys
100 105 110

Ala Thr Tyr Val Ser Arg Tyr Val Lys Thr Ser Arg Leu Lys Gln Glu
115 120 125

Glu Phe Phe Gly Ala Ala Lys Phe Met Lys Ile Gly Asp Leu Lys Gly
130 135 140

Phe Phe Gly Leu Leu Met Val Asn Ile Gln Gln Leu Arg Thr Lys Leu
145 150 155 160

Lys Ile Leu Asp Asn Thr Tyr Gly Asn Gly Thr Ala Asn Thr Ala Leu
165 170 175

Val Tyr His His Gly Lys Leu Leu Ala Leu Gln Glu Ala Asp Lys Pro
180 185 190

Tyr Val Ile Lys Val Leu Glu Asp Gly Asp Leu Gln Thr Leu Gly Ile
195 200 205

Ile Asp Tyr Asp Lys Arg Leu Thr His Ser Phe Thr Ala His Pro Lys

| | | |
|---|-----|---------|
| 210 | 215 | 220 |
| Val Asp Pro Val Thr Gly Glu Met Phe Thr Phe Gly Tyr Ser His Thr | | |
| 225 | 230 | 235 240 |
| Pro Pro Tyr Leu Thr Tyr Arg Val Ile Ser Lys Asp Gly Ile Met His | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Asp Pro Val Pro Ile Thr Ile Ser Glu Pro Ile Met Met His Asp Phe | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Ala Ile Thr Glu Thr Tyr Ala Ile Phe Met Asp Leu Pro Met His Phe | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Arg Pro Lys Glu Met Val Lys Glu Lys Lys Met Ile Tyr Ser Phe Asp | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Pro Thr Lys Lys Ala Arg Phe Gly Val Leu Pro Arg Tyr Ala Lys Asp | | |
| 305 | 310 | 315 320 |
| Glu Leu Met Ile Arg Trp Phe Glu Leu Pro Asn Cys Phe Ile Phe His | | |
| 325 | 330 | 335 |
| Asn Ala Asn Ala Trp Glu Glu Glu Asp Glu Val Val Leu Ile Thr Cys | | |
| 340 | 345 | 350 |
| Arg Leu Glu Asn Pro Asp Leu Asp Met Val Ser Gly Lys Val Lys Glu | | |
| 355 | 360 | 365 |

Lys Leu Glu Asn Phe Gly Asn Glu Leu Tyr Glu Met Arg Phe Asn Met
 370 375 380

Lys Thr Gly Ser Ala Ser Gln Lys Lys Leu Ser Ala Ser Ala Val Asp
 385 390 395 400

Phe Pro Arg Ile Asn Glu Cys Tyr Thr Gly Lys Lys Gln Arg Tyr Val
 405 410 415

Tyr Gly Thr Ile Leu Asp Ser Ile Ala Lys Val Thr Gly Ile Ile Lys
 420 425 430

Phe Asp Leu His Ala Glu Ala Glu Thr Gly Lys Arg Met Leu Glu Val
 435 440 445

Gly Gly Asn Ile Lys Gly Ile Tyr Asp Leu Gly Glu Gly Arg Tyr Gly
 450 455 460

Ser Glu Ala Ile Tyr Val Pro Arg Glu Thr Ala Glu Glu Asp Asp Gly
 465 470 475 480

Tyr Leu Ile Phe Phe Val His Asp Glu Asn Thr Gly Lys Ser Cys Val
 485 490 495

Thr Val Ile Asp Ala Lys Thr Met Ser Ala Glu Pro Val Ala Val Val
 500 505 510

Glu Leu Pro His Arg Val Pro Tyr Gly Phe His Ala Leu Phe Val Thr
 515 520 525

Glu Glu Gln Leu Gln Glu Gln Thr Leu Ile

530

535

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 19

attgaattca tgccttcagc ttcaaac

27

<210> 20

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 20

attggatccc aaaagctaca cgctgggtccc c

31

<210> 21

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 21

atatatctag aatgccttca tcagcttcaa acacttgg

38

<210> 22

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 22

atataggatc cctccggcac cggcgcgaag ttcccg

36

<210> 23

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 23

cccgggatcc ctcaagcctc tctataccg

29

<210> 24

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 24

cccgggatcc tttatacgga ttctgaggga g

31

<210> 25

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 25

attgaattca tggactctgt ttctttcttct tcc

33

<210> 26

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 26

attgaattct taaagcttat taaggtcact ttcc

34

<210> 27

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

synthesized sequence

<400> 27

aagaattcat ggcggagaaa ctcagtgatg gcagc

35

<210> 28

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 28

aaaagaattc ggcttatata agagtttggt cctgg

35

<210> 29

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 29

cgggatccat gcaacactct cttcggttctg atcttcttc

39

<210> 30

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 30

cgggatcctc agaaaacttg ttccttcaac tgattctcgc

40

<210> 31

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 31

attgaattca tggtttcttt cacggcaacg gc

32

<210> 32

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 32

gttttcccag tcacgac

17

【図面の簡単な説明】

【図 1】

乾燥または再吸水処理による CPRD65 遺伝子の発現のノーザンブロット解析を示す図である。生育 8 日目のカウピーを 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, および 12 時間の乾燥処理、または、10 時間乾燥処理を行った後、0, 1, 2, 5, 10, および 24 時間再吸水処理し、全 RNA を調製した。各レーンには、10 μ g の全 RNA をロードした。RNA は 1% アガロースゲルで分画し、ナイロン膜にブロットした後、 $[^{32}\text{P}]$ ラベルした CPRD65 クローンの cDNA インサートをプローブにしてハイブリダイズさせた。

【図 2】

CPRD65、VP14 (Zea mays のネオザンチン開裂酵素, Schwartz, S.H. et al., Science. 276: 1872-1874, 1997)、および LeNCED1 蛋白質 (Lycopersicon esculentum のネオザンチン開裂酵素, Burbidge, A. et al., J. Exp. Bot., 47: 2111-2112, 1997; Burbidge, A. et al., Plant J., 17:427-431, 1999) の予想アミノ酸配列の比較を示す図である。ハイフンは、アライメントを最適化するために挿入したギャップを表す。囲みは同一のアミノ酸を表す。影を付けた部分は

、類似したアミノ酸を表す。

【図 3】

カウピー品種 2246 のゲノム DNA のサザンブロット解析を示す図である。ゲノム DNA (各レーン $10 \mu\text{g}$) を EcoRI (E)、HindIII (H)、および XbaI (X) で切断し、1% アガロースゲルで分画した後、ナイロン膜に転写した。フィルターは、 $[^{32}\text{P}]$ ラベルした CPRD65 cDNA 断片とハイブリダイズさせた。「A」と「B」は、それぞれストリンジェンシーの異なるハイブリダイゼーションの条件を表す (実施例参照)。DNA 断片のサイズマーカーは kbp で示されている。

【図 4】

(A) 高塩 (NaCl)、高温、低温、およびアブシジン酸処理 (ABA) による CPRD65 遺伝子の誘導のノーザンブロット解析を示す図である。処理後、図示した時間にカウピーから全 RNA を単離した。各レーンには、全 RNA を $10 \mu\text{g}$ ずつロードした。各レーンの上に処理時間 (時間) を示した。

(B) 10 時間の乾燥処理の有無による CPRD65 遺伝子のノーザンブロット解析を示す図である。各レーンには、カウピー品種 2246 の葉、茎、および根から単離した全 RNA を $10 \mu\text{g}$ ずつロードした。RNA は、1% アガロースゲルで分画し、ナイロン膜にブロットした後、 $[^{32}\text{P}]$ ラベルした CPRD65 cDNA インサートをプローブにしてハイブリダイズさせた。

【図 5】

GST (A) または GST-CPRD65 組換え蛋白質 (B) のカロテノイド代謝の HPLC 特性を示す図である。シス-ネオザンチンを基質として含む反応混合液を用いた。c N; シス-ネオザンチン、C25; C25 産物。

【図 6】

CPRD65N-sGFP キメラ蛋白質のプロトプラストにおける色素体ターゲティングを示す図である。35S-sGFP 構築物 (A, C, E) または 35S-CPRD65N-sGFP キメラ構築物 (B, D, F) を *A. thaliana* から調製したプロトプラストにポリエチレングリコール (PEG) を用いてトランスフェクトした。トランスフェクトしたプロトプラストを光学顕微鏡 (A, B)、または緑 (E, F) または赤 (C, D) の干渉フィルターを付けた蛍光顕微鏡で観察した。E および F は GFP、C および D は葉緑体

の局在を示す。

【図 7】

乾燥におけるABAの蓄積とCPRD65遺伝子発現との関係を示す図である。図 1 のナイロンフィルター上の放射活性を定量し、図示したようにプロットした。ABAの定量方法は、実施例を参照のこと。エラーバーは標準誤差を示す。実験は3回行った。

【図 8】

器官毎に分離したカウピーを乾燥処理した時の内生アブシジン酸（ABA）の蓄積を示す図である。ABAの定量方法は図 7（実施例 7）と同様に行った。

【図 9】

AtNCED3とCPRD65のアミノ酸配列を比較を示す図である。ハイフンは、アライメントを最適化するために挿入したギャップを表す。囲みは同一のアミノ酸を表す。影を付けた部分は、類似したアミノ酸を表す。

【図 1 0】

AtNCED1、2、3、4、および 5 のアミノ酸配列のアライメントを示す図である。ハイフンは、アライメントを最適化するために挿入したギャップを表す。囲みは同一のアミノ酸を表す。影を付けた部分は、類似したアミノ酸を表す。

【図 1 1】

AtNCED1、2、3、4、5、および CPRD65 のアミノ酸配列とデータベース上にある関連する配列との関係を調べるため系統樹解析を行った結果を示す図である。LeNCED1はトマト由来（Ac.No. Z97215）、VP14はトウモロコシ由来（Ac.No. U95953）の蛋白質を示す。

【図 1 2】

各種ストレスに対するAtNCED遺伝子の発現を示す図である。

【図 1 3】

AtNCED3の形質転換体におけるAtNCED3遺伝子の発現を示す図である。上段は乾燥処理前、下段は乾燥ストレス処理後の植物のAtNCED3遺伝子の発現を示す。AtNCED3遺伝子のセンス鎖を発現する植物体（過剰発現）（AおよびB）ならびにアンチセンス鎖を発現する植物体（発現抑制）（CおよびD）は、それぞれ2系統用い

て試験を行った。

【図 1 4】

AtNCED3の形質転換体における内生ABA量を示す図である。野生型に比べ、AtNCED3遺伝子のセンス鎖を発現する植物体（過剰発現）（AおよびB）では内生ABA量の上昇が、アンチセンス鎖を発現する植物体（発現抑制）（CおよびD）では内生ABA量の減少が認められた。

【図 1 5】

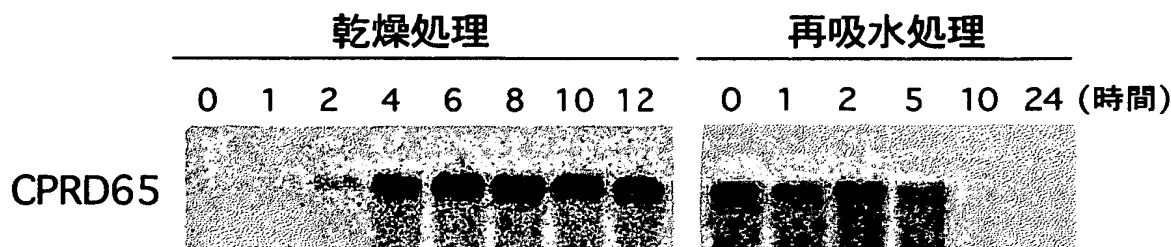
ネオザンチン開裂酵素トランスジェニック植物の乾燥耐性試験の結果を示す図である。灌水停止から14日後の植物とその植物の葉の相対水分量を示す。

【図 1 6】

ネオザンチン開裂酵素トランスジェニック植物の乾燥耐性試験の結果を示す図である。灌水停止から17日後の植物を示す。

【書類名】 図面

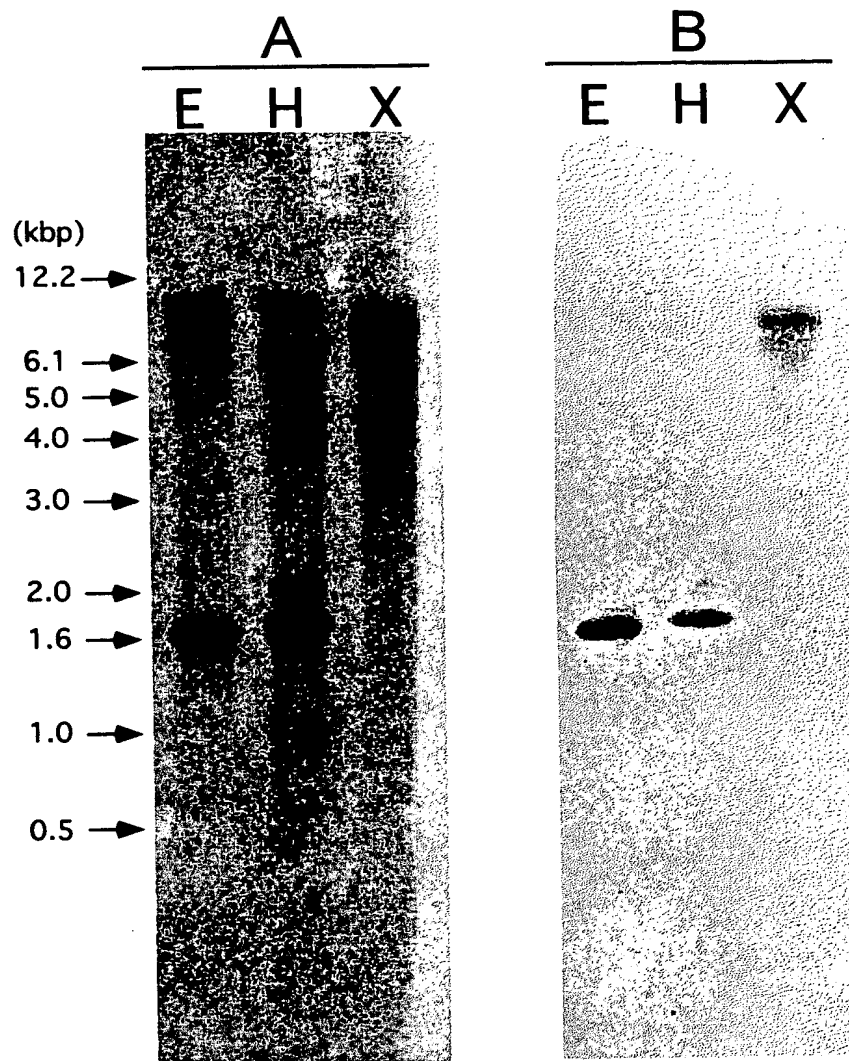
【図 1】



【図 2】

| | | |
|---------|---|-----|
| CPRD65 | PPSSASNTWFNATLPSPPFKDLPSTSSPTNLLPLRKTSSNTITCSLDLHFPKQYQPTSTSTSTATTTTPTPIKTTTTTTTTPRETNP | 90 |
| VP14 | MDGLAPPTSVSIIHRHLPARSRARASNSVRFSP-RAVSSVPPAEC-LQA-PFHK-----PVADLPAPSRKPAAI--AVPGHAAAPRKAEG | 79 |
| LeNCED1 | PAATTISH---ATNTWIKT-KLSMPSSKEFGFAS-NSISLLKNQHN-RQSLNINS---SLQAPPILHFPKQSSNYQTPKNNTISHPKQEN- | 80 |
| CPRD65 | LSDTNQPLPQKWNFLQKAAATALDLVETALVSHERKHPKLTADPRVQINGNFAPVPEHAADQGLPVVGTIPKCIDGVYVRNGANPLYEP | 180 |
| VP14 | -GKKQLNLFQR-AAAAALDAFEEGFVANVL---ERPHGLPSTADPAVQIAGNFAPVPEERPPVHELVPVSGRIPPFIIDGVYVRNGANPCFDP | 164 |
| LeNCED1 | -NNSSSSSSTSKMNLVQKAAAHALDAVESALTKELEPLPQTADPRVQISGNFAPVPEENPVCSLPVITGIPKCVQGVYVRNGANPLYEP | 169 |
| CPRD65 | VAGHHFDGDGMVHAVKFTNGAALSYACRFETETRLSDEKSLGRPVFPKATIGELHGHSGIARLLFYARGLFGLVDSSKGTGVANAGLVY | 269 |
| VP14 | VAGHHFDGDGMVHALRIRNGAALSYACRFETETRLQERAIGRPVFPKATIGELHGHSGIARLLFYARAACGLVDPSAGTGVANAGLVY | 254 |
| LeNCED1 | TAGHHFDGDGMVHAVQKNGSALSYACRFETETRLVDEKALGRPVFPKATIGELHGHSGIARLLFYARGLFGLVDSSKGTGVANAGLVY | 258 |
| CPRD65 | FNNHLLAMSEDDLPHYVRITPNGLDITVGRYDFNGQLNSTMIAHPKLDPVGGDLHALSYDVIQKPYLKYFRFSPDGKSDVEIPLKEPT | 359 |
| VP14 | FNGRLLAMSEDDLPHYVRVADDGDLITVGRYDFNGQLGCMIAHPKLDPATGELHALSYDVIKRPYLKYFRFRPDGKSDVEIPLKEPT | 344 |
| LeNCED1 | FNNRLLAMSEDDLPHYVVTPTGDLITVGRYDFNGQLKSTMIAHPKLDPVSGELHALSYDVIQKPYLKYFRFESKNGKSDVEIPLVEDPT | 348 |
| CPRD65 | MDHDAITENFVVPDQVVFKLTEMIRGGSPVVDKNI-SRFGILDKNAQDANAMRWLDAPDCFCFHLWNANEPEETEMVVGSCMTP | 449 |
| VP14 | MDHDAITENFVVPDQVVFKLCEMLRGGSPVVDKEKTSRFGILPKHADASEMAWVDVDCFCFHLWNANEDEATCEMVVGSCMTP | 434 |
| LeNCED1 | MDHDAITENFVVPDQVVFKLSEMLRGGSPVVDKNI-SRFGILDKNAQGSOLKWEVDPDCFCFHLWNANEFAETDEMVVGSCMTP | 438 |
| CPRD65 | ADSIFNECEELKSVLEIRLNLRTGSTRRPIISDAEQ-VNLENGMVNRNKLGRKTQFAYLAAEPWPKESGFAKVDLLSGEVKKMYG | 538 |
| VP14 | ADSIFNESDERLESVLEIRLDARTGRSTRAVLPSSQQ-ENLENGMVNRNLLGRESRYAYLAAEPWPKESGFAKEDLSTGELTKFEYG | 523 |
| LeNCED1 | ADSIFNECEELKSVLEIRLNLRTGSTRKSIENPDEQVNLENGMVNRNKLGRKTEYAYLAAEPWPKESGFAKVDLLFTGEVEKFIYG | 528 |
| CPRD65 | EEKFGGEPFLP-----NGQKEDDGYLLAFVHDEKEWKSELQVNAQNLKLEASIKLPSRVPYGFHGTFTISKDLRQQA | 612 |
| VP14 | EGRFGGEPFLPMDPAAAHPRGEDDGYLLAFVHDERAGTSELLVNAADIRLEATVQLPSRVPYGFHGTFTIGQLEAQAA | 604 |
| LeNCED1 | DNKYGGEPFLPRDP---NSKEEDDGYLLAFVHDEKEWKSELQVNAQSLKLEATVQLPSRVPYGFHGTFTINANDANQA | 605 |

【図 3】



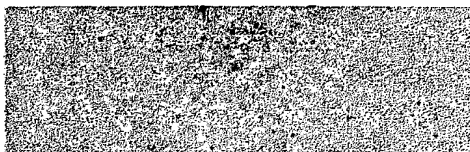
【図 4】

(A) 0 1 2 5 10 24 (時間)

塩



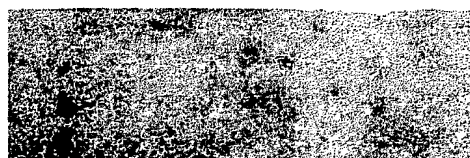
ABA



水



高温



低温



(B)

処理時間 0 10 (時間)

組織

根 茎 葉

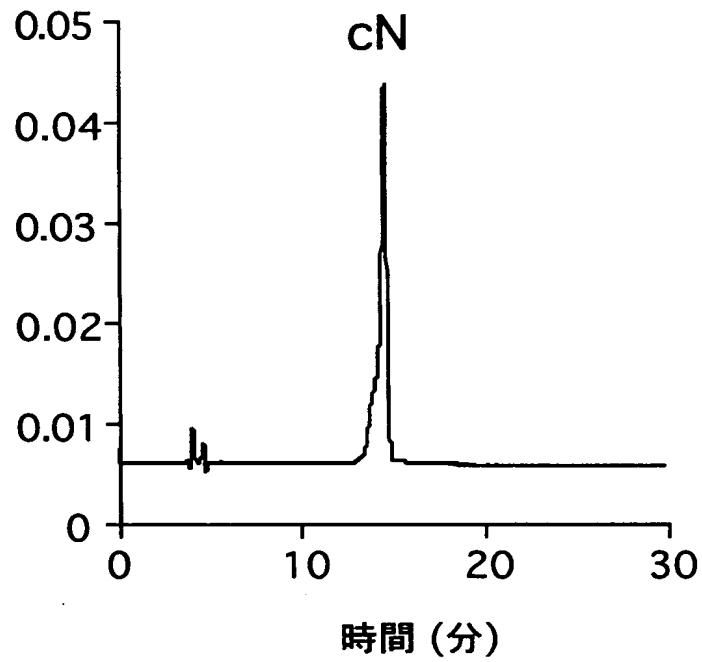


根 茎 葉

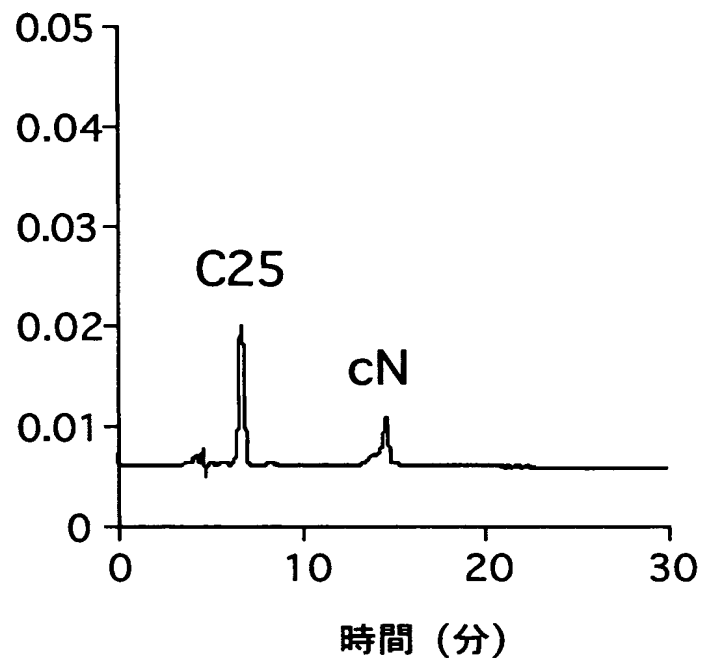


【図 5】

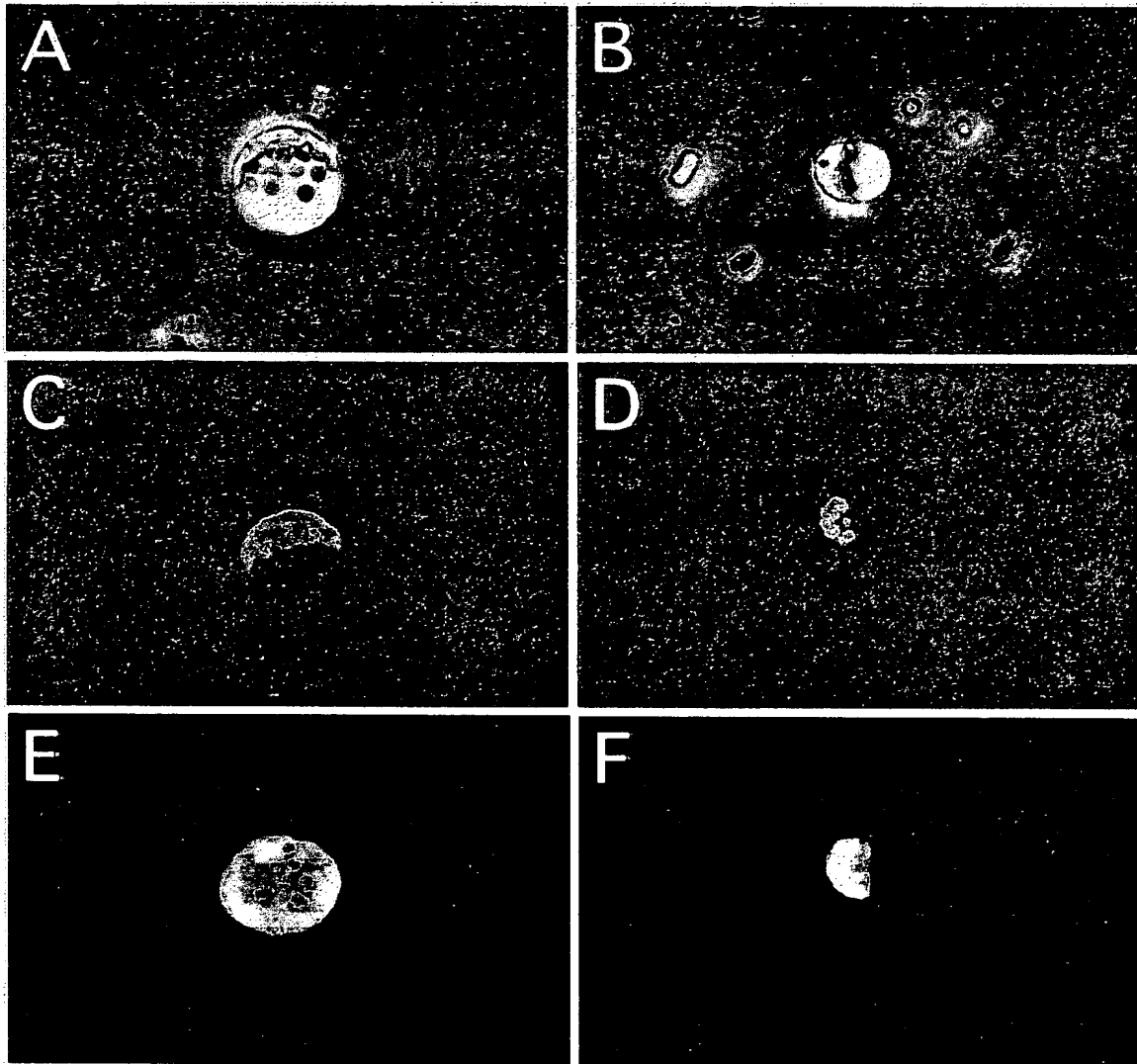
(A)



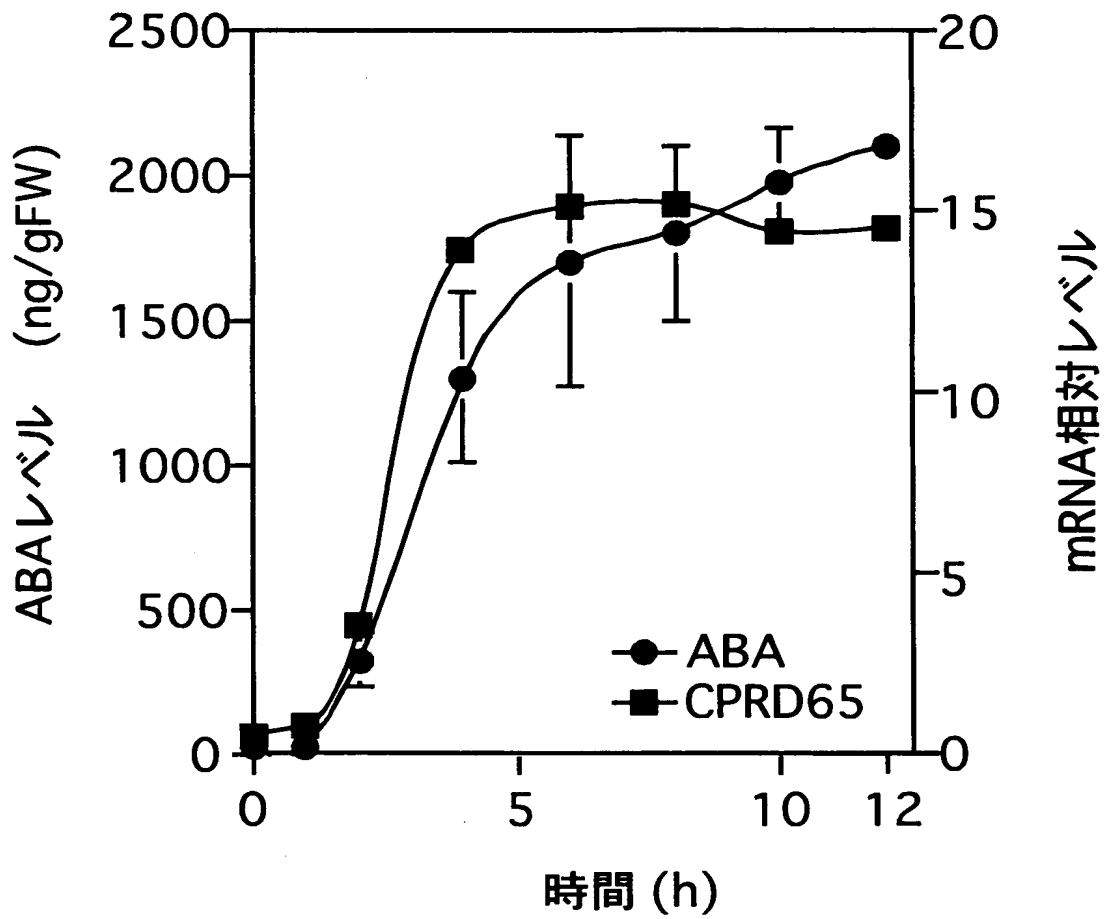
(B)



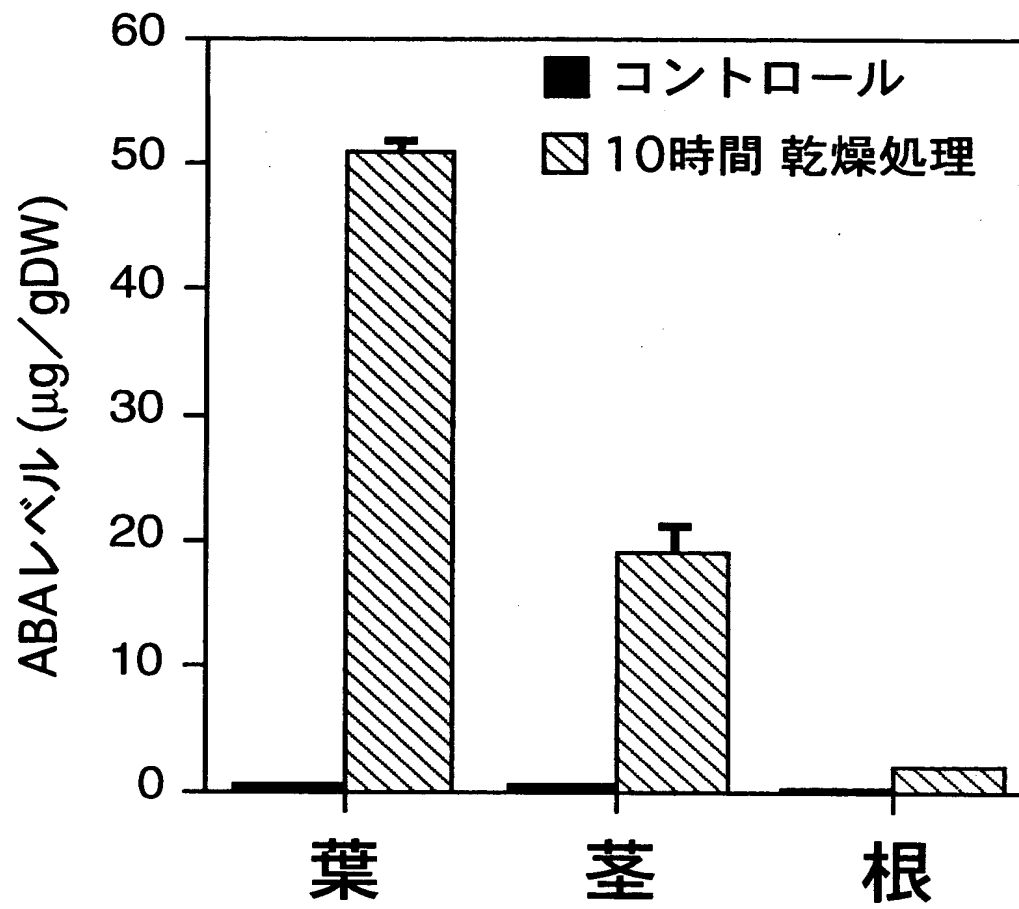
【図 6】



【図 7】



【図 8】



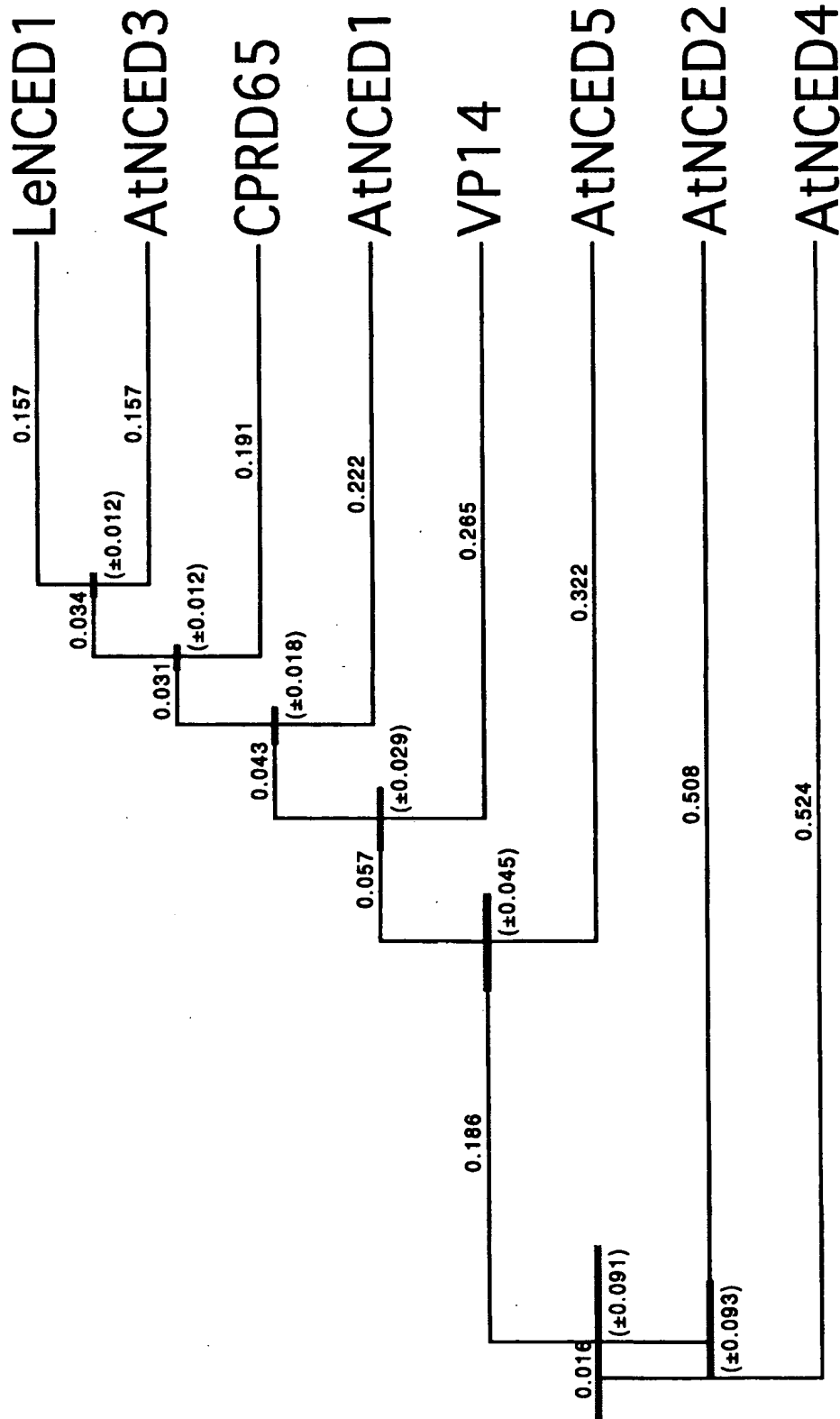
【図 9】

| | | |
|-------------------|---|------------|
| AtNCED3 CPRD65 | MPS-----FIATAAVSG-RNLGGNHTQP---PLSSSQSSDLSYCS--SL-PMASRVTRKLNVSALHTPPALH MPSSASNTWENATLPSPPFKDLPSTSSPTNLLPLRKTSSNTITCSQTLHHPKQYQTSTSTATTITPTPIK | 61 75 |
| AtNCED3 CPRD65 | FPKQSSNSPAIVKPL--KAKESNTKQNLFPFAAAALDAAEGLVLSHEKLHPLPKTADPRVQIAGNFAPVNEQP TTTTTTTTTPPRETNPLSDTNQPLPQKNFLQKAAATALDLVEITALVSHERKHPLPKTADPRVQIAGNFAPVNEHA | 134 150 |
| AtNCED3 CPRD65 | VRRNLPVVGKLPDSIKGVYVRNGANPL-EPVIGHHFFDGDGMVHAVKFEHGHASYACRFTITNRFVQERQLGRPV ADQQLPVVGKLPKCIDGVYVRNGANPL-EPVIGHHFFDGDGMVHAVKFTNGHASYACRFTETQRLSQEKS LGRPV | 209 225 |
| AtNCED3 CPRD65 | FPKATGELHGHIGIARLLFYARAAAGIVDPAHGI GVANAGLVYFNGRLLAMSEDDLPHYVITPNGDLITVGRF FPKATGELHGHIGIARLLFYARGLFGIVDGSQGI GVANAGLVYFNHLLAMSEDDLPHYVITPNGDLITVGRY | 284 300 |
| AtNCED3 CPRD65 | DFDGLSTMTIAHPKDPESGELHALSYDVYKPYLKYFRFSPDGIKSPDVEITLDCPTMMHDFAITENFVVVPD DFNGQLSTMTIAHPKDPVGGELHALSYDVYKPYLKYFRFSPDGIKSPDVEITLKEPTMMHDFAITENFVVVPD | 359 375 |
| AtNCED3 CPRD65 | QQVVFKLHEMITGGSPVYDKNKVARFGILKNAEDSSNIKWIDAPDCFCFHLWNAWEEPETDEVVIGSCMTPP QQVVFKLHEMITGGSPVYDKNKTSRFGILKNAEDANAMRWIDAPDCFCFHLWNAWEEPETDEVVIGSCMTPA | 434 450 |
| AtNCED3 CPRD65 | DSIFNESDENLKSVLSEIRLNLKTGHSTRRPIISNEDQVNLEAGMVNRNMLGRKTIFAYLALAEPPWPKVSGFAK DSIFNECEENLKSVLSEIRLNLKTGHSTRRPIISDABQVNLEAGMVNRNMLGRKTIFAYLALAEPPWPKVSGFAK | 509 524 |
| AtNCED3 CPRD65 | VDLTIGEVKKHLYGDNRYGGEPLFLPGEGGEDHGYILFVHDEKHWKSELQIVNAVSLVEAIVKLPSRVPYGF VDLSGEVKKMYGEEKFGGEPLFLP-NGQKEDHGYILFVHDEKHWKSELQIVNAQNLKLEASIKLPSRVPYGF | 584 598 |
| AtNCED3 CPRD65 | HGTFIGADDLAKQVV HGTFIHSKDLRKQA- | 599 612 |

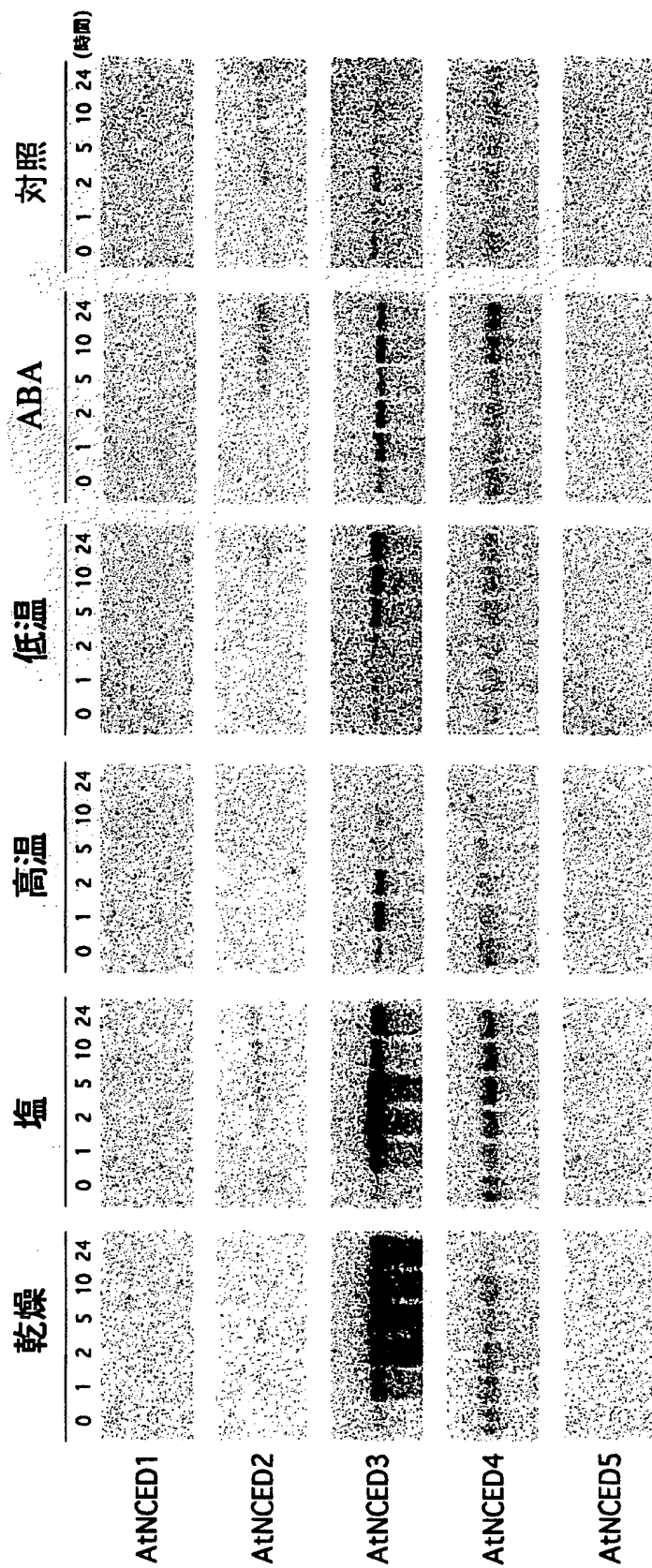
【図 10】

| | | |
|--------|---|-----|
| AtNCE1 | M/SL-LTMPMS---GGIKTWPO---AQ-IDLGF-RPIKROPKV-----IKCTVOIDVTELTKKROLFTRTTAT | 60 |
| AtNCE2 | MDSVSSSSFLS---STFSLHHS---LLRRSSSPTLLRINSAW---EERSPTINPSDNDNRNRPKTLHNR | 64 |
| AtNCE3 | MASFATAAVSGRMLGGNHTQPLSSSQSSDLSYCSLPMASRVTRKLNVSALHTPPALHFPKQSSNSPAIVK | 75 |
| AtNCE4 | MA-----EKLSDGS-----TITSVHPRPS----- | 19 |
| AtNCE5 | MDHSLRSDLLPTKTSRSHLLPQPKNANISRRILINPKIPTLPDLTSPVPSPVKLKPTYPNLNLLQKLAATMLD | 75 |
| AtNCE1 | P--POHNPLRLNIFQKAAATDAERALTSHEQDSPLPKTADPRVQIAGNYSVPRESSVRRL-TVEGTFDCI | 132 |
| AtNCE2 | NHTLVSSPPKLRPMTLATALFTTVEDVINTFIDPPSRP-SVDPKHVLSDFAPVLDELPTDCEITHGTUPLSL | 138 |
| AtNCE3 | PKAKESNTKQNNLFQRAAAAALDAEGLVLSHEKHLPLPKTADPSVQIAGNFAPVNEQPVRRNL-PWIGKLPSI | 149 |
| AtNCE4 | -----KGF-----SSKLLDLLERLVKLMHDASLPHY-----LSGNFAPTRDETTPVKOLPVHGLPECL | 75 |
| AtNCE5 | KIESSIVIPMEQNRPLPKPTDPAVOLSGNFAPVNECPVQNG-----LEWQDTPSCL | 127 |
| AtNCE1 | DGYIRNGNMFPEPTAGHIFDGGGMFAVKIT-NGSASYACRFITIRLVQEKRLGRPVFPKATIGELHGS-G | 205 |
| AtNCE2 | NGAYIRNGNDFLPRGPYHIFDGGGMFAIKCIH-NGKATLCSRVVKTYKYNMEKOTIGAPVPMVFSGFNGVTS | 212 |
| AtNCE3 | KGYVIRNGNPLHEPVTHHIFDGGGMFAVKFE-HGSASYACRFITIRLVQEKRLGRPVFPKATIGELHGT-G | 222 |
| AtNCE4 | NGEFVIRGNPKFDAVAGYHIFDGGGMHIVRIK-DGKATVSRVMTSRLKQEEFFGAARFK-IGDLKGF-F-G | 147 |
| AtNCE5 | KGYVIRNGNMFPLAGHIFDGGGMFAVSTGFDQVSYSCRYTKIRLVQETALGRSVFPKPIGELHGS-G | 201 |
| AtNCE1 | IARLMFYARGLCGLINNGAGVANAAGLVYFNRLAMSEDDPYDLKITOTIGDLTVGRYDFDGLKSAMIAH | 280 |
| AtNCE2 | VARGALTAARVLTGOYNPVNGIGLANTSLAFFSNRLALGEDDPYAVRLTESQDETHGRYDFDGLKMSMTIAH | 287 |
| AtNCE3 | IARLMFYARAAAGVDPAGHIGVANAAGLVYFNRLAMSEDDPYDVOITPNGDLKTVGRFDHGLQESTIMIAH | 297 |
| AtNCE4 | LLMNTQQLRTKLKLDNTYNGHANTALVYHNGLLALQADKPYIKVLEIGDLTGITIDYDKRLTHSFIAH | 222 |
| AtNCE5 | LARLALFARAGTGLVDGTRGAGVANAQWFFNRLAMSEDDPYDKIDGQDLTGIRFGFDQDSSVIAH | 276 |
| AtNCE1 | PKDPVTKELHALSYDWKPKLYFRFSPDGKSPLEETPLEPTIMHDFAITENFWVPDQQWFKLGEM-- | 352 |
| AtNCE2 | PKDPLTGETFAFRYGPV-PPPLIYFRFDSAGKQDVPIT-SMTPSPFLHDFAITKRHAIFAETQLGVRMMLDL | 361 |
| AtNCE3 | PKVDPESGELFALSYDWKPKLYFRFSPDGKSPDVELQLDPTIMHDFAITENFWVPDQQWFKLPBM-- | 369 |
| AtNCE4 | PKDPVTGEMFTFGYS-HTPPLIYRVISKQDMDHPVLT-TISEPTIMHDFAITETATFMDLPMHFRPKEM-- | 293 |
| AtNCE5 | PKVDATTGLHLTLYNWKPKHLYKFNTGCKTQVETLPEPTIMHDFAITENFWVPDQQWFKLSEM-- | 348 |
| AtNCE1 | ISGKSPV-VFDGKVSRLGDMPKDATEASQIDWNSPETFCFLINAWESPETEE---IV---VIGSQMSPADSI | 420 |
| AtNCE2 | VLEGGSPVGTDNCKTPRLGIPKYAGDESEMWFVPGFNTIHAINWDEDDGNS---VV---LTAPNIMSTIHT | 430 |
| AtNCE3 | IRGGSPV-VYDKNVARHGLDKYAEDESSNIMWDAPDCFCFLINAWEEPETDE---VV---VIGSQMTPPDSI | 437 |
| AtNCE4 | VKEKMIYSFDPKVARHGLPRYAKDELMIMWFELNCFIFHINAWEEDE---VLTICRLNPOLDMSGK | 365 |
| AtNCE5 | IRGGSPV-IYVKEVARHGLSKQDLTGSIDWIMWDCFCFLINAWERTTEEGDPVIV---VIGSQMSPDITI | 419 |
| AtNCE1 | FNERDESLSVLSEIRINLRTKTRRSLLV--NEDVNLQGMV-NRNLGRKTRFAFALAYPWPKVSGFAKVD | 492 |
| AtNCE2 | LIERMDLVHALVEVKIDLVTGIVRRHPTISA-----RNLDFAVI-NPAFLGRCSRYVYAAIGDPMKISGVKLD | 498 |
| AtNCE3 | FNERDENLKSVLSEIRLNILKTGSTRPTTSNEDQVNLQGMV-NRNLGRKTKFAYLALAEPPWKVSGFAKVD | 511 |
| AtNCE4 | VKEKLENFGNELYEMRFNMKTSASQKLSASAVDFPRINECYTGKORYVYGTILDSIAKVTGTIKFDLHAEAE | 440 |
| AtNCE5 | FSESGEPTRVLESEIRLNMRKESNRKVIVT---GVNLEAGHI-NRSYVGRKSQFVYIALADPWKCSGTAKVD | 489 |
| AtNCE1 | LCTGEMKKYIYGGEKYG-G-EPFFLPGN--SGNGEENEDGYIFCHVDEETKISELOITNAVNLKLE--ATIK | 560 |
| AtNCE2 | VSKGDRDDCTVARMYSGCYGGEFFVARDPQNPAAEEDGYWVTVHDEVTGESKFLVMDAKSPELETVAVR | 573 |
| AtNCE3 | LTTGEVKKHLYGDNRYG-G-EPLFLPGE--GGEDE---GYLCPVHDEKTKISELOITNAVSLVE--ATVK | 575 |
| AtNCE4 | TGRMLEVGGNIKGTIDUG--EGRYGSEATYVPRETAEEDGYLFRVHDENTGSCVTVIADKIMSAPVAWE | 513 |
| AtNCE5 | IQNGTVSEFNYGPSRFG-G-EPCFVPEG--EGEEDK---GYMGFVHDEKDESEFWVVAIDMKQV--AAVR | 553 |
| AtNCE1 | LPRVPYGFHGTIF/DSNELVDQL-- | 583 |
| AtNCE2 | LPRVPYGFHGTIF/KESDLNKL-- | 595 |
| AtNCE3 | LPRVPYGFHGTIFIGADDLAKO-VV | 599 |
| AtNCE4 | LPRVPYGFHALF/TEQLDEOTLI | 538 |
| AtNCE5 | LPRVPYGFHGTIF/SENQLKEQ-VF | 577 |

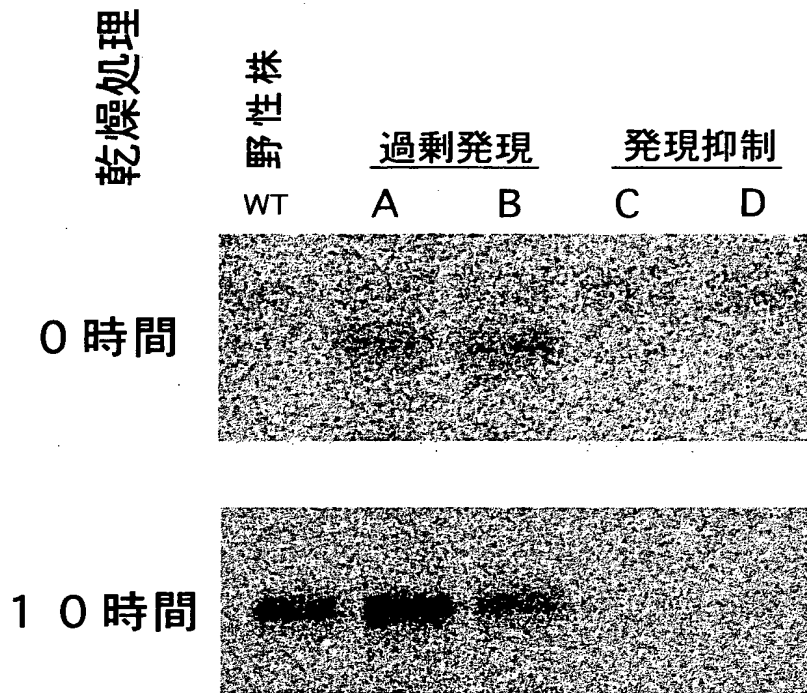
【図 11】



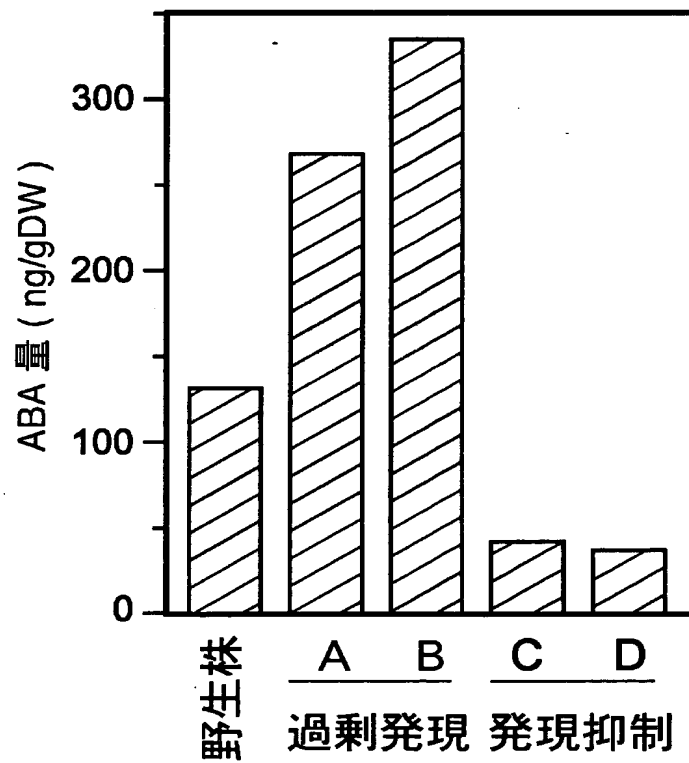
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】

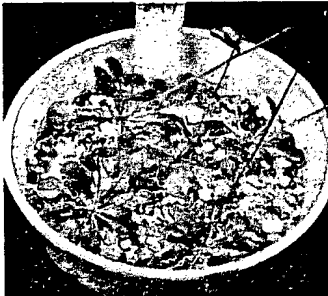


【図15】

過剰発現

野生株

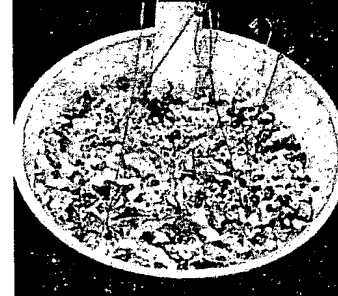
発現抑制



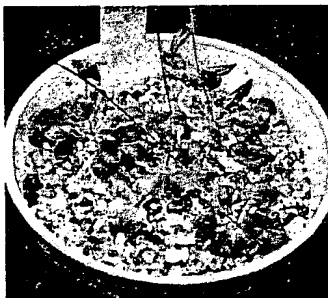
A



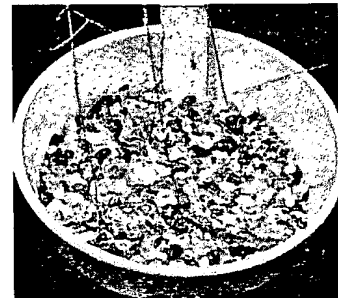
Col.



C

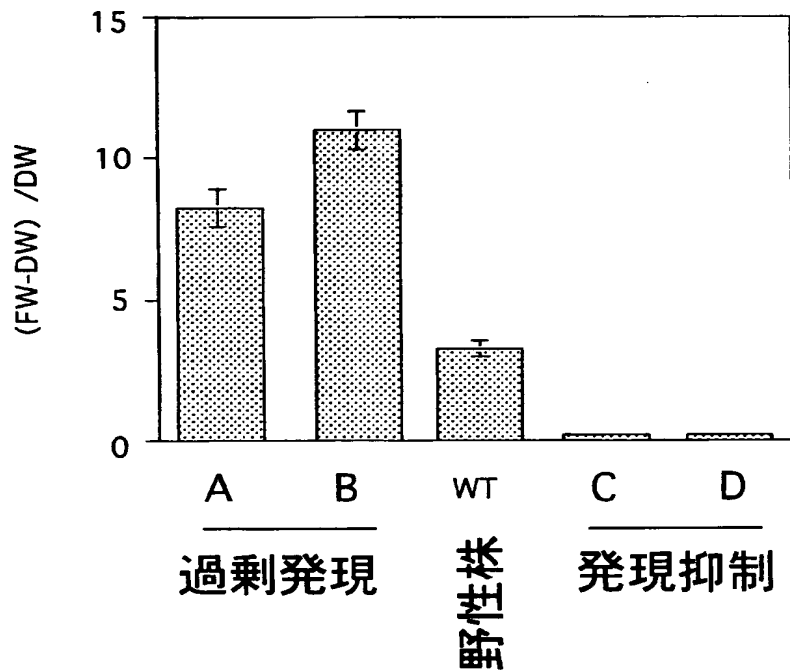


B



D

耐性評価14日後の植物の水分

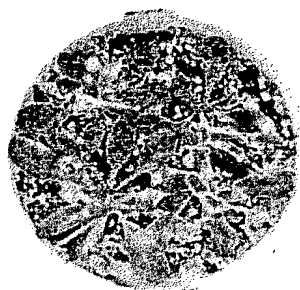


【図16】

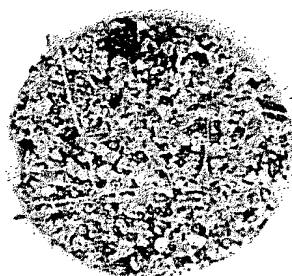
過剰発現

野生株

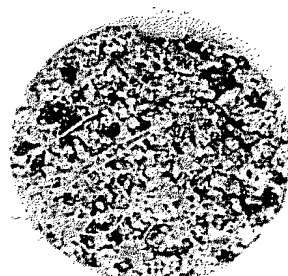
発現抑制



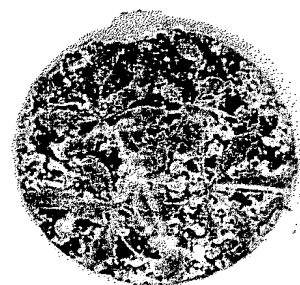
A



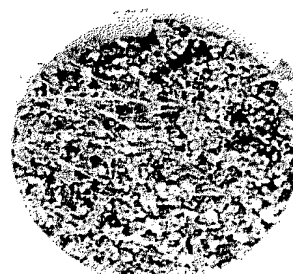
Col.



C



B



D

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 植物のストレス耐性を上昇させるために用いられるネオザンチン開裂酵素をコードするDNA、該DNAを植物に導入することにより、植物のストレス耐性を上昇させる方法、および、ネオザンチン開裂酵素の遺伝子が導入されたトランスジェニック植物を提供することを課題とする。また、植物のストレス耐性を低下させるために用いられるDNA分子、該DNAを植物に導入することにより、植物のストレス耐性を低下させる方法、および、該DNAが導入されたトランスジェニック植物を提供することを課題とする。

【解決手段】 ネオザンチン開裂酵素遺伝子をセンスまたはアンチセンスに導入したトランスジェニック植物を作製した。センスを導入した植物はストレス耐性が有意に上昇し、アンチセンスを導入した植物は有意に低下することが判明した。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006792]

1. 変更年月日 1990年 8月28日
[変更理由] 新規登録
住 所 埼玉県和光市広沢2番1号
氏 名 理化学研究所